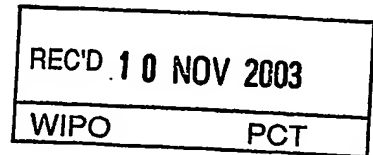


REC'D PCT/PTO 17 FEB 2005



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 58 971.2

Anmeldetag: 16. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

Bezeichnung: Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

IPC: A 23 K, C 12 N, A 01 H

Bemerkung: Die nachgereichte vollständige Seite 60 der Beschreibung ist am 10. Januar 2003 eingegangen.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Scholz

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Scholz

Patentansprüche

1. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.
5
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet werden.
10
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.
15
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
20
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.
25
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.
30
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
35

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
- 5 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
- 10 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Eidotter.
- 10 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
- 15 12. Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfutterkomponenten.
- 20 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.
- 25 14. Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 30 15. Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 35 16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.



17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
18. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
25. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.
26. Tierfutterzubereitung, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

zentellen der Gattung Tagetes.

5 27. Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

10 28. Pigmentiermittel nach Anspruch 27, bestehend aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

29. Pigmentiermittel nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

10

Aufgrund seiner farbgebenden Eigenschaften wird Astaxanthin als Pigmentierstoff in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

5

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliches Astaxanthin, wird heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

20

Synthetisches oder durch Isolierung gewonnenes natürliches Astaxanthin wird durch spezielle Formulierungstechniken zur Erhöhung der Lagerfähigkeit chemisch und/oder physikalisch stabilisiert und für den jeweiligen Verwendungszweck entsprechend der gewünschten Applikationsbereiche und Bioverfügbarkeiten aufbereitet.

25

WO 9201754 beschreibt eine astaxanthinhaltige Wildtyppflanze der Spezies *Adonis aestivalis*. Ferner offenbart das Dokument die Verwendung der astaxanthinhaltigen Petalen von *Adonis aestivalis* sowie deren Extrakte als Fischfutter oder als Zusatz in Fischfutter zur Pigmentierung von Fischen.

30

Die Verwendung von *Adonis aestivalis* als pflanzliche Quelle für Astaxanthin zur Pigmentierung von Fischen im Stand der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass der Ertrag an astaxanthinhaltiger Biomasse und damit an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial pro Anbaufläche sehr gering ist, und somit nur doch kostenintensiven Anbau großer Flächen eine befriedigende Menge an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial erhalten werden kann. Dies führt zu hohen Kosten bei der Herstellung entsprechender Pigmentiermittel.

35

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Pigmentiermittel zur Verfügung zu stellen, die den Nachteil des Standes der Technik nicht mehr aufweisen.

5 Demgemäss wurde gefunden, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere verwendet werden können.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden bevorzugt Pflanzen der Gattung Tagetes verstanden, die in mindestens einem Teil der Pflanze einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Das Astaxanthin kann in freier Form in Form von Fettsäure-Di- oder Monoester vorliegen. Bevorzugte Pflanzen der Gattung Tagetes sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies Tagetes erecta, Tagetes patula, die auch als Marigold bezeichnet werden, Tagetes lucida, Tagetes pringlei, Tagetes palmeri, Tagetes minuta, Tagetes lemmonii, Tagetes tenuifolia, oder Tagetes campanulata, besonders bevorzugt Tagetes erecta oder Tagetes patula.

20

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzenteilen von Pflanzen der Gattung Tagetes werden vorzugsweise Teile von Pflanzen verstanden, die in mindestens einem Teil des Pflanzenteils einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Bevorzugte Pflanzenteile sind beispielsweise Blüten, Blütenköpfe oder besonders bevorzugt Blütenblätter, die auch als Petalen bezeichnet werden.

25

Wildtyppflanzen der Gattung Tagetes weisen kein Astaxanthin jedoch Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin in Blüten auf. Es wurde jedoch erfindungsgemäss gefunden, dass die Pflanzen der Gattung Tagetes beispielsweise durch genetische Veränderung in die Lage versetzt werden können, Astaxanthin herzustellen.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Pflanzen der Gattung Tagetes beispielsweise dadurch in die Lage versetzt Astaxanthin herzustellen, indem in den genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes im Vergleich zum Wildtyp eine Ketolase-Aktivität verursacht wird.

35 Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

3

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

5 Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes* verstanden.

10 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) der Gattung *Tagetes* oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* oder beides verstanden werden.

15 Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Astaxanthin jeweils eine Referenzpflanze – verstanden.

20 Diese Referenzpflanze der Gattung *Tagetes* ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*, ganz besonders bevorzugt *Tagetes erecta* L., Accession number: TAG 72, Sorte Orangenprinz, erhältlich aus der Genbank des IPK, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.

25 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten β -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

35 Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität, vorzugsweise in Blütenblättern, auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, trans-

gen eine Ketolase zu exprimieren.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Pflanzen der Gattung *Tagetes* durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase.

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes*.

Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

Haematoccus pluvialis, insbesondere aus *Haematoccus pluvialis* Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

Alicycobaculum spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

5

Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

5 Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16),

10 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 81); Protein: Acc.-No. ZP_00111258 (SEQ ID NO: 82) (als putatives Protein annotiert),

15 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 83), Protein: (SEQ ID NO: 84) (nicht annotiert),

Synechococcus sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 85), Protein: Acc.-No. ZP_00115639 (SEQ ID NO: 86) (als putatives Protein annotiert), oder

20

Brevundimonas aurantiaca (WO 02079395).

25 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

30 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

6

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

5

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50°C, bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

10

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

20 Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

25

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

30 (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

(v) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder

35

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

- (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll; 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42_C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50_C (moderate Bedingungen), oder
- (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42_ (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50_C, oder
- (ii) 0.1X SSC bei 65_C, oder
- (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68_C, oder
- (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42_C, oder
- (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42_C, oder
- (vi) 2X SSC bei 65_C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren ab-

geleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:
Gap penalty 10
Gap length penalty 10
Pairwise alignment parameter:
K-tuple 1
Gap penalty 3
Window 5

Diagonals saved

5

-

5 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

10 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

15 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der tagetesspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Pflanzen der Gattung Tagetes leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze der Gattung ein.

20 In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze der Gattung ein.

25 Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, 30 Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

35

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, daß die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze der Gat-

tung *Tagetes* eingebracht.

5 Besonders bevorzugte Pflanzen der Gattung *Tagetes* als Ausgangspflanzen oder erfindungs-
gemäße genetisch veränderte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies *Tagetes*
erecta, *Tagetes patula*, die auch als Marigold bezeichnet werden, *Tagetes lucida*, *Tagetes*
10 *pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta*, *Tagetes lemmonii*, *Tagetes tenuifolia*, oder *Tagetes*
campanulata, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen der Gattung *Tagetes*
verwendet, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität
und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

5 Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,
am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe
einzuführen.

20 Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivi-
tät aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Prote-
in Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zea-
xanthin oder Astaxanthin verstanden.

25 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum
Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -
Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

30 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevor-
zugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %,
bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens
600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

35 Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, ei-
nen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

11

Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin umzuwandeln.

5 Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. die gebildete Menge β -Carotin erhöht.

10

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

15

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20

Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

25

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

30

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C

35

inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze der Gattung *Tagetes*.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder β -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen der Gattung

Tagetes eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase verstanden:

5 Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

10 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

15 Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

20 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β -Cyclase codiert, verwendet werden.

30 Bei genomischen Hydroxylase- bzw. β -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw. β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

35 Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

14

Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, codierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20).

5 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen der gattung Tagetes liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder β -Cyclase-Gen vor.

10 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase auf.

20 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

25 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO: 18 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

15

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

- 10 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

15

Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

20

Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

25

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.

- 30 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 35 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen der Gattung *Tagetes* gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität auf.

Unter ϵ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ϵ -Cyclase verstanden.

Unter einer ϵ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ϵ -Ionon-Ring zu überführen.

Unter einer ϵ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter ϵ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ -Carotin verstanden.

Bei einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge δ -Carotin reduziert.

Unter einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer ϵ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge, oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfol-

gen.

Eine Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer ϵ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ϵ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der ϵ -Cyclase). Vorzugsweise wird die ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. die ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder die ϵ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. des ϵ -Cyclase-Proteins oder der ϵ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

15

Die ϵ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP⁺, NADPH und ATP zugegeben werden.

20

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

25

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP⁺, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

30

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

35

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 5 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-dsRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein ϵ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 10 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein ϵ -Cyclase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 15 c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym – oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 20 d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 25 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 35 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem ϵ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes ϵ -Cyclase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen ϵ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer ϵ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

- 5 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer ϵ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der ϵ -Cyclase, des Transports der ϵ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion ei-
- 10 nes ϵ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

15

- a) Einbringen einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz (ϵ -Cyclase-dsRNA)

20

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

25

- Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Waston und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

30

- Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

35

Unter einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch ϵ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur

aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

5

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

10

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

5

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

20

Unter dem Begriff " ϵ -Cyclase-Transkript" wird der transkripierte Teil eines ϵ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der ϵ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

25

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

30

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

35

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

21

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-dsRNA Teile des ϵ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die
5 nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die ϵ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ϵ -Cyclase enthält.
10 Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer ϵ -Cyclase bewirken.
15

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

20 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.
25

Zur Transformation der Pflanze mit einer ϵ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die ϵ -Cyclase-dsRNA transkripiert wird.
30

Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
35

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

5 Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

10

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der ϵ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines ϵ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines ϵ -Cyclase-Gens.

20

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem ϵ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der ϵ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der ϵ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die ϵ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von ϵ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

25

30

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines ϵ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

35

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die ϵ -Cyclase-dsRNA

5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

10 Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

15 a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und

b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

20 Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer ϵ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

25

SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

30 SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

35

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die

24

jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer ϵ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

25

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

5 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenesspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

15

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer ϵ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

20

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

25

b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-antisenseRNA)

30

Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu vermindemde ϵ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der ϵ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

35

Eine ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese ϵ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der ϵ -Cyclase komplementär sein, sich auf die

5 kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die ϵ -Cyclase umfasst. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindes-

10 tens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. ϵ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert..

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenesspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

20 Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer ϵ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines ϵ -Cyclase-Gens (z.B. einem ϵ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-

25 helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des ϵ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

30 In einer weiteren Ausführungsform kann die ϵ -Cyclase-antisenseRNA eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

35

c) Einbringen einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA

angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzym-ähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindernenden ϵ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden ϵ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

- 30 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

Die Expression einer ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden ϵ -Cyclase-Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen ϵ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das

eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323.

- 5 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38.

- Bevorzugt ist die ϵ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der ϵ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-
10 untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen ϵ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

- 5 Eine Verminderung einer ϵ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren
20 zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl
25 Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 - 3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

30

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines ϵ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.

35

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die ϵ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotech-

nology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; White-
lam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

f) Einbringen von den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequen-
zen und Expressionskonstrukten

Die ϵ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen ϵ -Cyclase
RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell
SM et al. (1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral
induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem
Transkript einer zu vermindernenden ϵ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die
Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen
Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al.
(2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93;
Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant
Cell 10(6):937-46).

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert,
die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend
für ein ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 .

g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funkti-
onsminderung an ϵ -Cyclase-Genen

Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifi-
ziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-
Mutanten mittels gezielter homologer Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-
Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci
USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. se-
quenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)

Die Verminderung der ϵ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder
-Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rah-
men der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Se-
quenz kodierend für eine ϵ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination)
realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-
Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines ϵ -Cyclasegens oder benachbarter Se-
quenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch
eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das ϵ -Cyclase-Gen so

verändert wird, dass die Funktionalität des ϵ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des ϵ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionel-

5 len homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des ϵ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell

10 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten ϵ -Cyclase selektioniert.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht

20 werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-

25 methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidiny)l)butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.

30 Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976).

35 Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

31

Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Struktur-
aufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer ϵ -Cyclase aufweisen.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blüten-spezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

32

Besonders bevorzugt werden die genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes mit folgender Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

5 Genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen,

5 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen,

20 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

25 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

30 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei
35 oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -

Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von anti- ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder ϵ -Cyclase-Inverted-Repeat-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen der Gattung *Tagetes* und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes*, sowie die transgenen Pflanzen der Gattung *Tagetes* selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der

Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

5

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

10

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

20

Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649),

25

den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene,

30

170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

35

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzol-sulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0

335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

5 Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kalteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

10 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell

15 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-20 968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 25 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

30 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

35 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

5 Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

10 Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der AP3 Promoter aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Beispiel 1).

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

15 Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20 Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

25

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

30

35

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

37

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTCTGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGATCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTCTGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGCTGGATCC_BamHI

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTCTGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGGATCC_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen der Gattung *Tagetes* bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the

Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

5 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

10 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

15 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

20 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

25 Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utili-
30 zation, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

35 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke

in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

5 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

15

20 Zur Transformation einer Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

25

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

30

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

35

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* weisen im Vergleich zum Wildtyp einen Gehalt an Astaxanthin, insbesondere in Petalen auf.

Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung die Verwendung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltiger Extrakte von astaxanthinhalti-

gen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

10 Unter astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen werden bevorzugt Lösungen, enthaltend Astaxanthin verstanden, die durch Extraktion aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit mindestens einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt wurden. Je nach verwendetem Lösungsmittel und verwendeten weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsverfahren kann das Astaxanthin in beliebigen Reinheitsgraden im Extrakt vorliegen. Es ist vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile vor Extraktion entsprechend aufzubereiten, beispielsweise die Pflanzen oder Pflanzenteile zu trocknen und zu zerkleinern, wobei die Reihenfolge beliebig ist.

15 Astaxanthin kann aus den astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gegebenenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-ether oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch eine solche Extraktion lässt sich Astaxanthin mit hoher Konzentration anreichern.

20 Anschließend kann durch Ausschütteln von Astaxanthin und chromatografische Auftrennung des Gemisches die Reinheit von Astaxanthin weiter erhöht werden. Astaxanthin liegt in der Regel als Gemisch aus Mono- und Diestern vor, meist als Ester der Palmitinsäure.

25 Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. Astaxanthinhaltige Pigmentierstoffe pigmentieren und verursachen oder intensivieren in der Regel einen rosa bis rosa-roten Farbton.

30 Bevorzugte Tiere die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können sind Tiere, ausgewählt aus der Gruppe Fische, Crustaceae oder Vögel, insbesondere Galliformes und Anatridae.

Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle.

Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse.

- 5 Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse.

Bevorzugter Anatridae ist Flamingo.

- 10 Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten oder Gänse verstanden.

- 5 Die orale Verabreichung der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere kann direkt erfolgen oder über orale Verabreichung von Tierfütterzubereitungen, denen zuvor die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes beigemischt wurden.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfütterzubereitungen beigemischt und die Tierfütterzubereitung an Tiere oral verabreicht.

- 25 Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfütterzubereitungen in eine Form zu prozessieren, die eine Beimischung zu entsprechenden Tierfütterzubereitung ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.
- 30

Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfütterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

- 35 Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.

- 5 Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung beige-
10 mischt werden.

Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen eingesetzt werden.

- 15 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

- 20 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert,
25 kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

30

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfuttermitteln.

35

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen

mit Tierfuttermitteln ermöglicht.

- Beispielsweise für Fische können die Fischfutterzubereitungen weitere übliche Fischfutterkomponenten enthalten, wie beispielsweise Fischmehl und/oder andere Proteine, Öle, wie beispielsweise Fischöle, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.

Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

<i>Komponenten</i>	<i>Gew.-%</i>	Einwaage f. 500 kg
		<i>kg</i>
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

10

Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

<i>Komponenten</i>	<i>Gew.-%</i>
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80
Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidantien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

45

In einer Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in getrockneter und zerkleinerter Pulverform beigemischt.

- 5 Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, können bei Fischfutter beispielsweise in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Fischfutterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung, Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfzugaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.
- 15

- Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretenden Astaxanthinverluste zu vermeiden, können flüssige astaxanthinhaltige Extrakte durch die sogenannte PPA-Technik nach dem Extrusions - und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (*post pelleting application*).
- 20

- In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht.
- 25

- Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form zu prozessieren, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.
- 30

- Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.
- 35

Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die

astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

- 10 Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt oral an Tiere verabreicht werden.

Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen verabreicht werden.

Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

20

Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

- 25 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

- 30 Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

- 35 In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Pigmentiermittel aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie

vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

Bei besonders bevorzugten Pigmentiermitteln verwendet man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen.

5

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

10

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch oralen Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

15

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen- oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

20

Die Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bzw. Tierfuttermittel enthaltend diese Pigmentiermittel weisen weiterhin den Vorteil einer hohen Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit des Pigments Astaxanthin auf.

25

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel I

Herstellung astaxanthinhaltiger, genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes

30

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

35

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel I.1:

48

Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus
5 *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis*
(Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-
10 Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l $FeSO_4 \cdot xH_2O$) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension
15 wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.
20 Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1
25 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers
30 (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten
35 Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)

- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

5

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | |
|-----|------|------------|
| 1X | 94_C | 2 Minuten |
| 35X | 94_C | 1 Minute |
| 10 | 53_C | 2 Minuten |
| | 72_C | 3 Minuten |
| 1X | 72_C | 10 Minuten |

15

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

20

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbildung 1 und 2, Sequenzvergleiche).

25

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

30

Beispiel 1.2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus codiert

35

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

50

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

5

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

10

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

20

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | | |
|----|-----|------|------------|
| 25 | 1X | 94_C | 2 Minuten |
| | 35X | 94_C | 1 Minute |
| | | 53_C | 2 Minuten |
| | | 72_C | 3 Minuten |
| | 1X | 72_C | 10 Minuten |

30

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

- 35 Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Namersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressions-

vektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus plu-*
5 *vialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus in der korrekten Orientie-
rung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

Beispiel I.3:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille
10 (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus
der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der
gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR
15 unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15
(SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezi-
fischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide-
1 bis 39).

20 Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur
auf 40_C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 ml Reaktionsansatz, in dem enthal-
ten war:

- 1 mg pGKETO2 PlasmidDNA
- 25 - 0.1 mg PR15 (SEQ ID NO: 32)

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem
enthalten war:

- 30 - 11.5 ml pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

35 Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80)
bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde
mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines
sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers

(PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
20	53_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

25 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

30 Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

35 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit

53

fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO4.

Beispiel I.4:

- 5 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* codiert

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nostoc PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

10

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO₃, 0.04 g/l K₂PO₄·3H₂O, 0.075 g/l MgSO₄·xH₂O, 0.036 g/l CaCl₂·2H₂O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na₂CO₃, 1ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H₃BO₃, 1.81 g/l MnCl₂·4H₂O, 0.222 g/l ZnSO₄·7H₂O, 0.39 g/l NaMoO₄·2H₂O, 0.079 g/l CuSO₄·5H₂O, 0.0494 g/l Co(NO₃)₂·6H₂O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

15

- 20 Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc PCC7120*:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) re-

25 suspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde

30 durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

- Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc PCC 7120*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc PCC 7120* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 87) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG, SEQ ID NO. 88) amplifiziert.
- 35

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5

- 1 µl einer *Nostoc PCC 7120* DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 87)
- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 88)
- 10 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		55°C	1 Minuten
		72°C	3 Minuten
20	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 87 und SEQ ID No. 88 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 89). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

25

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc PCC 7120*.

30

Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

35

Beispiel I.5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

5 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

10 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

15 Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

20

Beispiel I.5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

25 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

30

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

35

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

56

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 5 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 10 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
5	35X	94_C 1 Minute
		50_C 1 Minute
		72_C 1 Minute
	1X	72_C 10 Minuten

- 20 Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

- 25 Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

- 30 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

- 35 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsan-

sätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 5 - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

10

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

15

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 0.5 mg A7/9 Amplifikat
- 0.25 mg A8/10 Amplifikat

30

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 17.6 mg A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spe-

zifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
20	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

25 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

35 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

Zur Herstellung einer Expressionskassetten pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

5

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

15

Beispiel 1.5.B:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

20

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

25

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion -635 bis -1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.90) und FNR-2 (SEQ ID No. 91) hergestellt.

30

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR1-2 (-635 bis -1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 100 ng genomischer DNA aus *A. thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 90)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 91)

60

- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
10	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment FNR Pro-

motor den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment *rbcS Transit Peptid* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *Nost Ketolase* (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5

Beispiel I.5C:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

- 10 Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

15

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.93) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) hergestellt.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

5

Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

10

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 93) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 96) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 95) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

15

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

25

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 93 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 95)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 96 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35	35X	94°C 1 Minute
		50°C 1 Minute
		72°C 1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

63

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und

5 Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A1/4 Amplifikat
- 0.25 µg A2/3 Amplifikat

10

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

15

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 93) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 94) amplifiziert.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

25 Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute

50°C 1 Minute
72°C 1 Minute
1X 72°C 10 Minuten

- 5 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 93 (AP3-1) und SEQ ID No. 94 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese
- 10 Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 15 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SphI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SphI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3NOST.

- 20 Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 25 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3NOST wurde das 2.6 KB bp SacI-XhoI (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 30

Beispiel I.6:

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

- 35 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20-200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

65

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

5

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-

- 10 Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28 °C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS
- 15 Medium resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

- Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend
- 20 werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Ta-
- 25 ge statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24 °C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis
- 30 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- 35 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurze-

lung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- 5 • Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden.
- 10 Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von AgNO_3 (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 15 • Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.
- 20

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

- 25 Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.
- Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3.

- 30 Beispiel I.8
Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

Beispiel I.8.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

35

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsernt und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel

wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 ml Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ml Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Beispiel I.9

Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 ml; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 ml Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0,75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 ml Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 ml Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0,35 g Na₂S₂O₄·10H₂O und 500 ml Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na₂S₂O₄·10H₂O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

Beispiel I.10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

- 5 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).
- 10 Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.
- 15 Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25
- 1 µl genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
 - 0.25 mM dNTPs
 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
 - 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
 - 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
 - 30 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 35
- | | | |
|-----|------|------------|
| 1X | 94_C | 2 Minuten |
| 35X | 94_C | 1 Minute |
| | 50_C | 1 Minute |
| | 72_C | 1 Minute |
| 1X | 72_C | 10 Minuten |

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

- 10 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

- 15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

20

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 25 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30

- | | | |
|-----|------|-----------------|
| 1X | 94_C | 2 Minuten |
| 35X | 94_C | 1 Minute |
| | 50_C | 2 Minuten |
| | 72_C | 3 Minuten |
| 35 | 1X | 72_C 10 Minuten |

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters,

70

AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 0.5 mg A7/9
- 0.25 mg A8/10

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 17.6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

- 20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 30 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | | |
|----|-----|------|------------|
| | 1X | 94_C | 2 Minuten |
| 35 | 35X | 94_C | 1 Minute |
| | | 50_C | 1 Minuten |
| | | 72_C | 1 Minuten |
| | 1X | 72_C | 10 Minuten |

71

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml p35SGUS INT
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 mM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII

(Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klon mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

- 5 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des *rbcs* Transit-peptides enthält, heisst pJA11 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

10

In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcs* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5

Beispiel I.11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

20

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

25

30 Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Vo-

35 lumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60_C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech)

73

nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

5

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 10 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 mM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 15 - 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 mM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 30 1X 94_C 2 Minuten
- 35X 94_C 1 Minute
- 58_C 1 Minuten
- 72_C 1 Minuten
- 1X 72_C 10 Minuten

35

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

74

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

75

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstruktkarte).

- 5 In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

- 10 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte).

- 15 In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment *CHRC* den Promoter (1537 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.12

- 20 Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

- 25 Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.
- 30

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel I.11 beschrieben.

- 35 Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel I.11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

76

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 mM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 mM PR49 (SEQ ID NO: 63)
- 20 - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25
- 1X 94_C 2 Minuten
- 35X 94_C 1 Minute
- 58_C 1 Minuten
- 72_C 1 Minuten
- 30 1X 72_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

35

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktions-

stellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat_Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJA11 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI
5 Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJA11. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJA14. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

10 Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJA14. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJA15. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.
15

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwen-
20 dung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A15 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus pJA15 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte).

In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp),
25 Fragment *3sense* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *3anti* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

30 Beispiel I.13

Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch
35 zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 11).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 mM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- | | | |
|-----|------|------------|
| 1X | 94_C | 2 Minuten |
| 35X | 94_C | 1 Minute |
| | 53_C | 1 Minute |
| | 72_C | 1 Minute |
| 1X | 72_C | 10 Minuten |

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 11).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

79

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.2 mM jedes dNTPs
- 0.2 mM PR60 (SEQ ID NO: 66)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 - 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 ml aufgefüllt

15

- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 93_C: 1 Minute, 95_C: 1 Minute
- 20 5X 94_C: 30 Sekunden, 62_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten
- 1X 94_C: 30 Sekunden, 25_C: 3 Minuten, ramp to 72_C in 3 Minuten, 72_C: 2.5 Minuten
- 15X 94_C: 10 Sekunden, 68_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;
- 94_C: 10 Sekunden, 68_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;
- 25 94_C: 10 Sekunden, 29_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten
- 1X 72_C: 5 Minuten

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30 - 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 35 - 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ml aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

12X 94_C: 10 Sekunden, 64_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;

94_C: 10 Sekunden, 64_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;

5 94_C: 10 Sekunden, 29_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten

1X 72_C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10 - 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 100 ml aufgefüllt

20 Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20X 94_C: 15 Sekunden, 29_C: 30 Sekunden, 72_C: 2 Minuten

1X 72_C: 5 Minuten

25 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 12).

30 Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

35 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

Beispiel I.14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von

81

Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterr gion der Epsilon-Cyclase cDNA).

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel I.10) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel I.10) mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel I.13) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 mM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 Öl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 0.2 mM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)

- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5 1X 94_C 2 Minuten
35X 94_C 1 Minute
53_C 1 Minuten
72_C 1 Minuten
1X 72_C 10 Minuten

10

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

15

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJA11 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

20

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJA11. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

25

30

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

35

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunia (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon

wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet. -

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert.

Das AP3P-Promoterfragments aus pJA11 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp Sall-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5A17 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5C17 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte).

In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CA17 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 15, Konstruktkarte)

In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment *AP3P* das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

10 Beispiel I.15

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28_C / 20 bis 200 mE / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21_C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Der Agrobakterium tumefaciens Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5A13 transformiert. Die Anzucht des transformierten A. tumefaciens Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28_C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80

mMol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- 10 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

15

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden.
- 20 Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 25 • Die Zugabe von AgNO₃ (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 30 • Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5A13 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

Beispiel I.16:

Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

Das Blütenmaterial der transgenen Tagetes erecta Pflanzen aus Beispiel I.15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörst und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 ml Aceton resuspendiert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ug/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 2

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

Beispiel II

Herstellung astaxanthinhaltiger Pflanzenteile der Gattung Tagetes

Die Blütenköpfe oder die Petalen der gemäß Beispiel I.6 hergestellten astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden abgetrennt und getrocknet. Anschließend werden die getrock-

getrockneten Blütenköpfe oder Petalen durch Zerkleinerung in Pulverform überführt.

Beispiel III

Herstellung von astaxanthinhaltigen Extrakten und weitere Aufreinigung

5

Getrocknete Blütenblätter oder getrocknete Blütenköpfe von *Tagetes erecta*, hergestellt nach Beispiel I.6 werden in einem Homogenisator mit einem Überschuß (etwa 10 Teile Lösungsmittel mit einem Teil Pflanzenmaterial) an Lösungsmittel (wie z.B. Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Tetrahydrofuran, Ethanol, Heptan, Cycloheptan oder Petrolether, aber nicht ausschließlich beschränkt auf diese) oder mit einem Lösungsmittelgemisch (wie z.B. Aceton/Hexan, Ethanol/Hexan (50:50, v/v) oder Aceton/Methanol (7:3, v/v) homogenisiert und im Dunkeln und in der Kühle unter Schütteln extrahiert. Der Rückstand kann bis zu dreimal mit dem verwendeten Lösungsmittel/ Lösungsmittelgemisch re-extrahiert werden. Das gesammelte organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wird mittels Evaporator evaporiert, bis ein eingeeengtes Konzentrat erhalten wird. Zusätzlich kann nochmals mit Hexan extrahiert werden. Das verwendete Hexan wird (wiederum im Dunklen und in der Kühle) evaporiert.

15

Das solchermaßen hergestellte Konzentrat wird in Hexan gelöst und mittels Säulenchromatographie mit Silica-Material chromatografiert. Ein Teil Silicamaterial wird dazu mit 1-2 Teilen Carotinoidlösung vermischt und in eine Säule gepackt. Die Säule wird ausgiebig mit Hexan im Dunklen und in der Kühle gewaschen. Das Eluat wird verworfen. Ketocarotinoide, besonders Astaxanthin, wird durch eine Mischung von Hexan und Ethanol (2-5% Ethanol in Hexan) eluiert, bis eine orange-rötliche Fraktion eluiert. Dieses orange-rötliche Eluat wird gesammelt, bis die Farbe sich ändert. Das orange-rötlich gefärbte Eluat enthält Astaxanthin als Gemisch aus Mono- und Diestern.

25

Beispiel IV

Herstellung von extrudiertem Forellenfutter, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes*

30

Die folgenden Komponenten werden in einem Doppelschneckenextruder extrudiert.

Einwaage f. 500 kg		
Komponenten	(%)	Kg
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00

	88	
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

Die pulverförmigen, prozessierten astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes*, beispielsweise hergestellt nach Beispiel II, werden vor der Extrusion als Komponente zugegeben.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* in flüssiger Form, beispielsweise hergestellt nach Beispiel III, werden nach der Extrusion auf das Extrudat aufgesprüht (Applikation durch PPA-Methode).

Die Astaxanthin-Wirkstoff-Dosierung liegt bei 10, 20 und 40 mg Astaxanthin pro kg Diät.

Nach Beendigung des Extrusionsprozesses wird das Extrudat getrocknet und gekühlt.

Beispiel V

Orale Verabreichung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* an Forellen in einem Forellenstandardfutter – Prüfung der Bioverfügbarkeit.

Das Forellenfutter, enthaltend die erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierstoffe, wird gemäß Beispiel IV hergestellt und an Forellen (durchschnittliche Lebendmasse von 180 g) oral verabreicht. Es werden 3 Konzentrationen getestet: 10, 20 und 40 mg Astaxanthin aus der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung pro kg Diät.

Die Haltung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Die Forellen erhalten standardmäßig eine Adaptationsphase von 14 Tagen.
- Während des Fütterungsversuches werden 10 Forellen pro Becken in 80 l Wasser fassenden Durchfluß-Kunststofftanks gehalten. Die Wassertemperatur liegt bei 15°C. Das

Wasser wird biologisch gereinigt und es werden täglich mindestens 10% der Gesamtwassermenge durch Frischwasser ersetzt.

- 5 • Die Beleuchtungsdauer liegt bei 12 Stunden pro Tag, um eine vorzeitige Geschlechtsreife der Tier zu vermeiden.
 - Die Anzahl Becken pro Behandlung liegt bei 3. Dies ist äquivalent zu 30 Forellen pro Dosisstufe.
 - 10 • Aufbewahrung der Diäten erfolgt bei -20°C, um Astaxanthinverluste zu vermeiden. Das Futter wird portionsweise (wochenweise) aufgetaut und verabreicht.
 - Die Versuchsdauer beträgt 8 Wochen.
 - 15 Die Fütterung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:
 - Bei den verabreichten Versuchsdiäten handelt es sich um das gemäß Beispiel IV hergestellte extrudierte Forellenfutter, das zusätzlich noch öl-gecoated wird.
 - 20 • Während der Adaptationsphase wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin verabreicht.
 - Als Negativkontrolle wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin während des gesamten Versuchszeitraumes verabreicht.
 - 25 • Die Fütterung erfolgt 2x täglich von Hand bis zur Sättigung der Tiere.
- Untersucht wird der Einfluß der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung sowohl auf Leistungsparameter der Fische, wie Futteraufnahme, Futterverwertung und Lebendmassezuwachs als auch auf die Bioeffizienz der Pigmentierung.
- 30 Statisch ausgewertet werden durchschnittlicher Futterverbrauch pro Fisch, Futteraufwand und Lebendmassezuwachs.
- 35 Die Pigmentierung der Fische wird durch remissionspektrophotometrische Messungen (Minolta-Wert = Rotwert am Filetanschnitt) und durch Bestimmung des Astaxanthingehalts (mg/kg) im Filet jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.

Die Minoltawerte a-Werte, welche den Rotanteil des Farbtons repräsentieren, nehmen mit kleiner werdender Steigung der Funktion dosisabhängig zu. Die Minolta b- Werte, die den Gelbanteil widerspiegeln liegen im negativen Bereich oder bewegen sich um Null. Dies bedeutet der Rotton der Forellenfilets weist eine Abhängigkeit zu der aufgenommenen Astaxanthinmenge auf.

Während des Versuches werden für die beobachteten Leistungsparameter sowohl zwischen als auch innerhalb der Behandlungen (Astaxanthinhaltiges Pulver, astaxanthinhaltiger Extrakt in flüssiger Form, synthetisches Astaxanthin, Negativkontrolle) keine statistisch gerichteten Unterschiede beobachtet.

Es zeigt sich, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bei der Pigmentierung von Forellen als Vertreter der Salmoniden bioverfügbar sind und zudem zu keinen adversen Effekten auf die biologische Leistung der Forelle führen.

Abbildung 1: Nukleotidsequenzvergleich

```
KE102.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAGAGAGAGGTTGCAGGCAGCTCTGACGTGTTGC 10C
X86782.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAAGCGCTGAGGCACTCAAGGAGAGAGAGAGGTTGCAGGCAGCTCTGACGTGTTGC 10C

KE102.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTGCTTCGGTCAGAGGAGTCAGACGGCGCCCGCGGACTGAAGAATGCCTACAAGCCACCACCTTCGGACACAAAGGG 20C
X86782.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTGCTTCGGTCAGAGGAGTCAGACGGCGCCCGCGGACTGAAGAATGCCTACAAGCCACCACCTTCGGACACAAAGGG 20C

KE102.seq CATCACAATGGCGCTAGCTGTTCATCGGCTCCTGGGCGCGCAGTGTTCCTCCAGGCCATTTTTCAATCAAGCTTCGGACCTCCTTGGACCACTGCACTGG 30C
X86782.seq CATCACAATGGCGCTAGCTGTTCATCGGCTCCTGGGCGCGCAGTGTTCCTCCAGGCCATTTTTCAATCAAGCTTCGGACCTCCTTGGACCACTGCACTGG 30C

KE102.seq CTGCCCCGTGTCAATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCTGCTGCACATCGTCGTAGTATTCTTGTCTCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 40C
X86782.seq CTGCCCCGTGTCAATGCCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCTGCTGCACATCGTCGTAGTATTCTTGTCTCTGGAGTTCCTGTACACAGGCC 40C

KE102.seq TTTTATCACCACGCATGCTATGCTATGCCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCGAGTATGCATCTCCTTGTAGCCCTG 50C
X86782.seq TTTTATCACCACGCATGCTATGCTATGCCACCATCGCCATGAGAAACAGGCAGCTTAATGACTTCTTGGGCGAGTATGCATCTCCTTGTAGCCCTG 50C

KE102.seq GTTTGATTACAACATGCTGCACCGCAAGCAITGGGAGCACCAACCAACTGGCGAGGTGGCAAGGACCTGACTTCACAGGGGAAACCTTGGCATT 60C
X86782.seq GTTTGATTACAACATGCTGCACCGCAAGCAITGGGAGCACCAACCAACTGGCGAGGTGGCAAGGACCTGACTTCACAGGGGAAACCTTGGCATT 60C

KE102.seq GTGCCCTGGTTTGCCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGCGCGCCTGSCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGCGCCAA 70C
X86782.seq GTGCCCTGGTTTGCCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGCGCGCCTGSCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGCGCCAA 70C

KE102.seq TGGCGAACCTGCTGCTGTTTCATGGCGGCGCGCCCATCTGTCCGCTTCCGCTTGTTCACCTTTGGCACGTACATGCCCCACAAGCCTGAGCCTGGCGC 80C
X86782.seq TGGCGAACCTGCTGCTGTTTCATGGCGGCGCGCCCATCTGTCCGCTTCCGCTTGTTCACCTTTGGCACGTACATGCCCCACAAGCCTGAGCCTGGCGC 80C

KE102.seq CGCGTCAGGCTCTTCACACAGCGTCATGAACGGTGGAGTCGCGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 90C
X86782.seq CGCGTCAGGCTCTTCACACAGCGTCATGAACGGTGGAGTCGCGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 90C

KE102.seq CACTGGGAGCACCAACCGCTGGCCCTTTGCCCCCTGGTGGGAGCTGCCCACTGCCGCCGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCCCTGCTAG 99C
X86782.seq CACTGGGAGCACCAACCGCTGGCCCTTTGCCCCCTGGTGGGAGCTGCCCACTGCCGCCGCTGTCTGGCCGAGGTCTGGTTCCCTGCTAG 99C
```

Abbildung 2: Proteinsequenzvergleich

```
KETO2.pro  M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A 50
X86782.pro  M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A 50

KETO2.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100
X86782.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100

KETO2.pro  L P V S D A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150
X86782.pro  L P V S D A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150

KETO2.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200
X86782.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200

KETO2.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250
X86782.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250

KETO2.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300
X86782.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300

KETO2.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329
X86782.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329
```

Abbildung 3:

Konstrukt zur Überexpression des Ketolase
(b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit
rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des
d35S-Promoters (Tagetesttransformationskonstrukt)

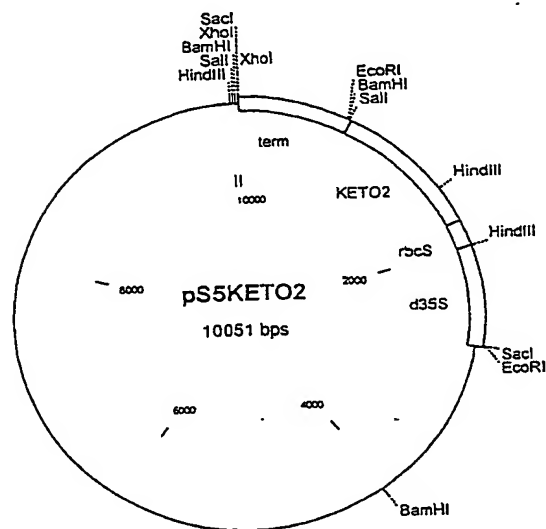


Abbildung 4:

Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Zielfesttransformationskonstrukt) .

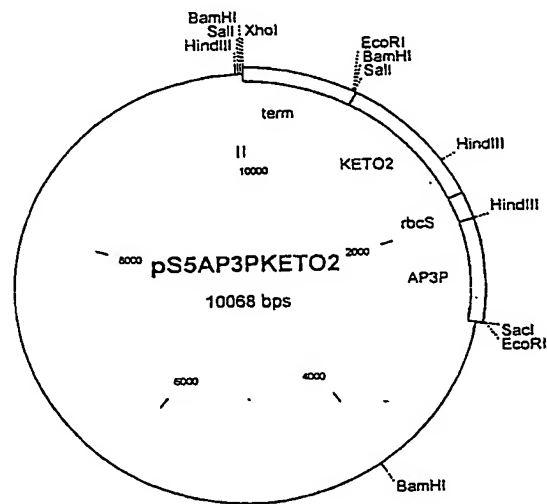


Abbildung 5

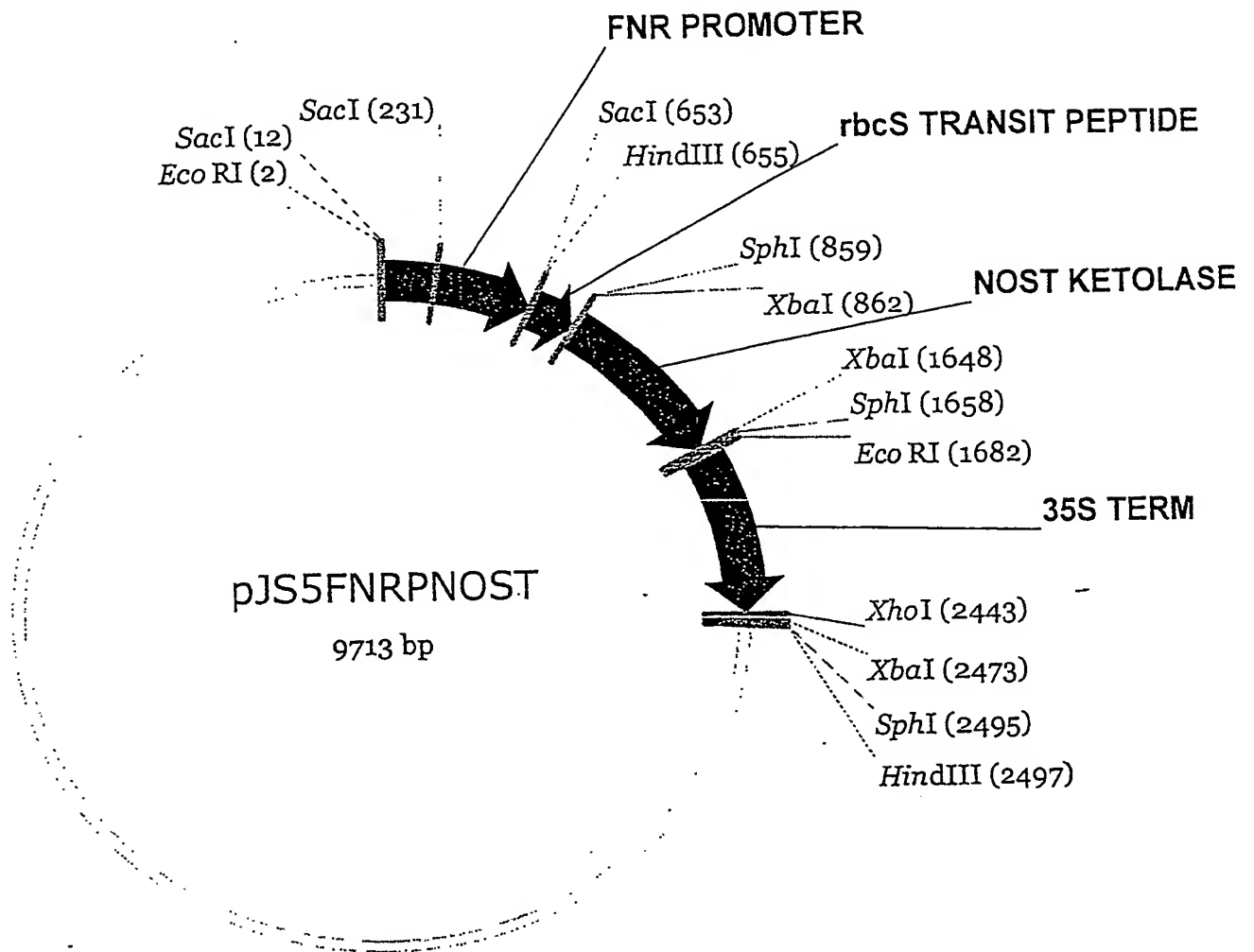


Abbildung 6

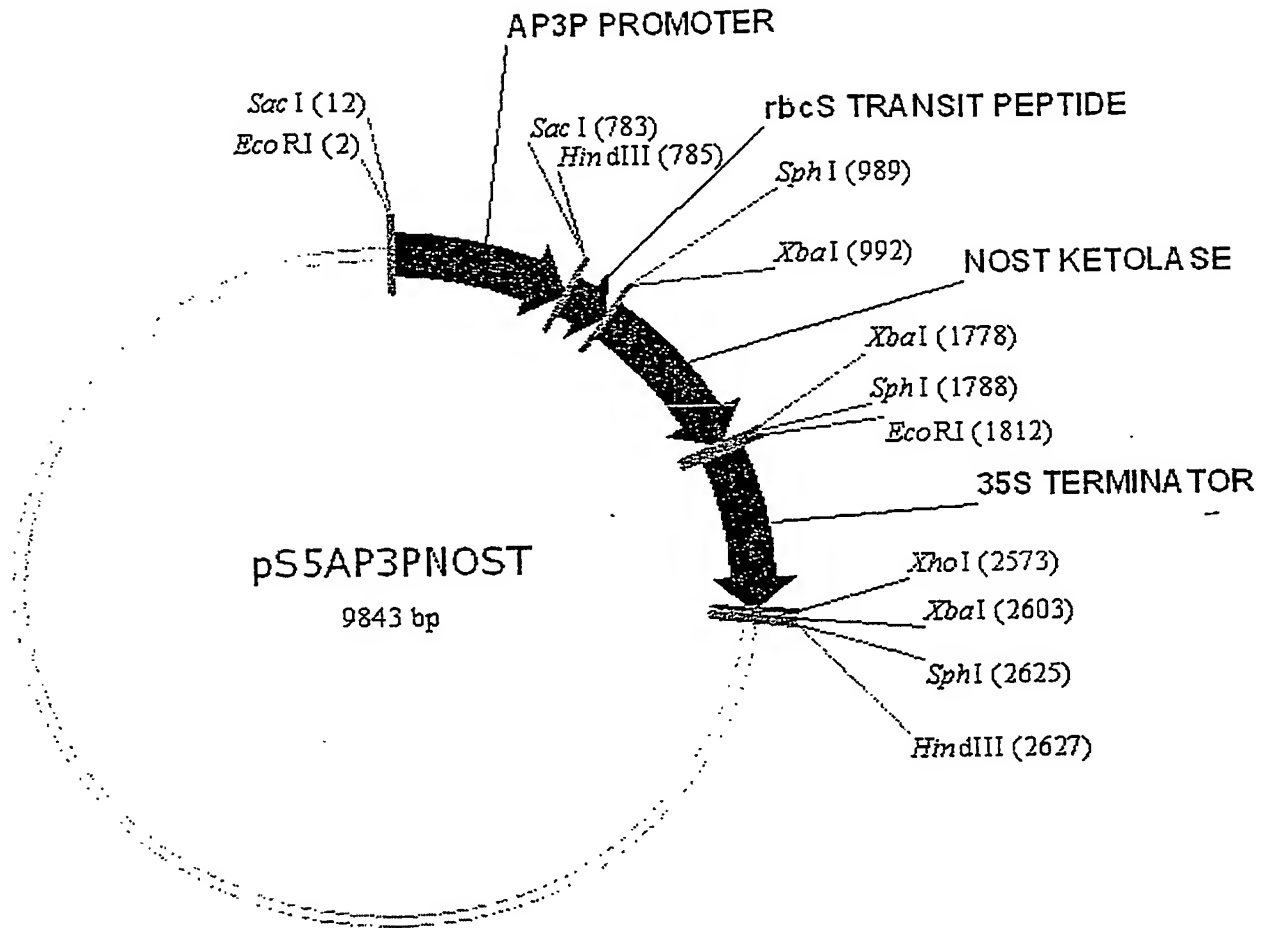
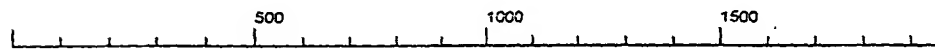
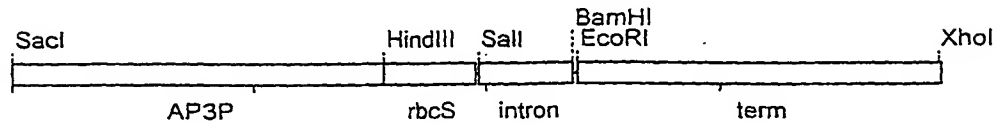


Abbildung 7: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*



pJAI1 (1966 bps)

Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen
Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend
5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA
(AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

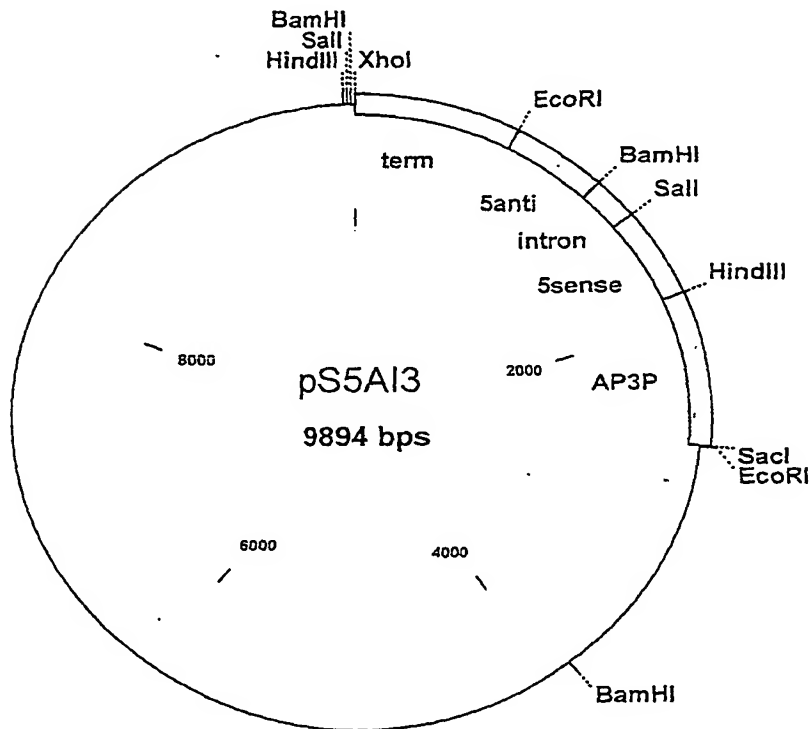


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen
Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend
5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA
(AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

5

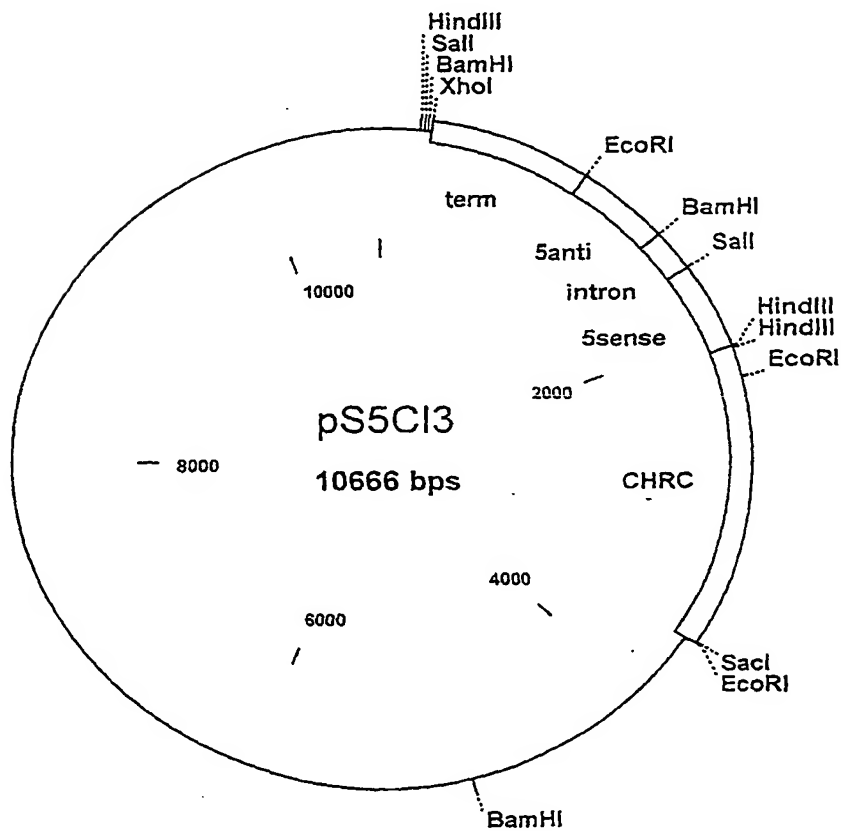


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen
Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend
3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA
(AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

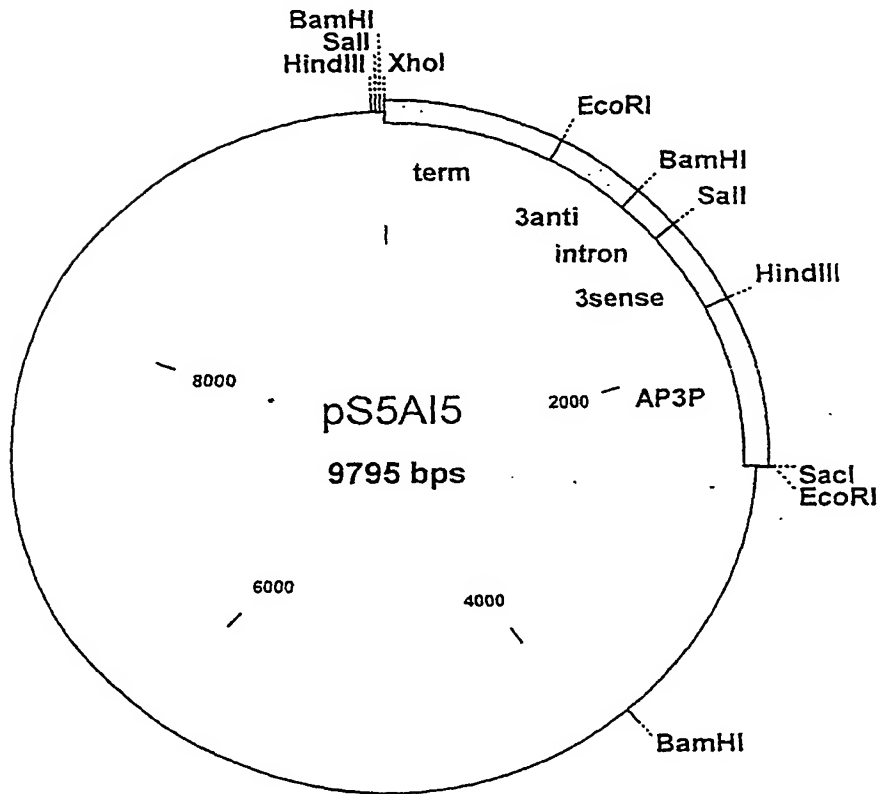


Abbildung 11: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

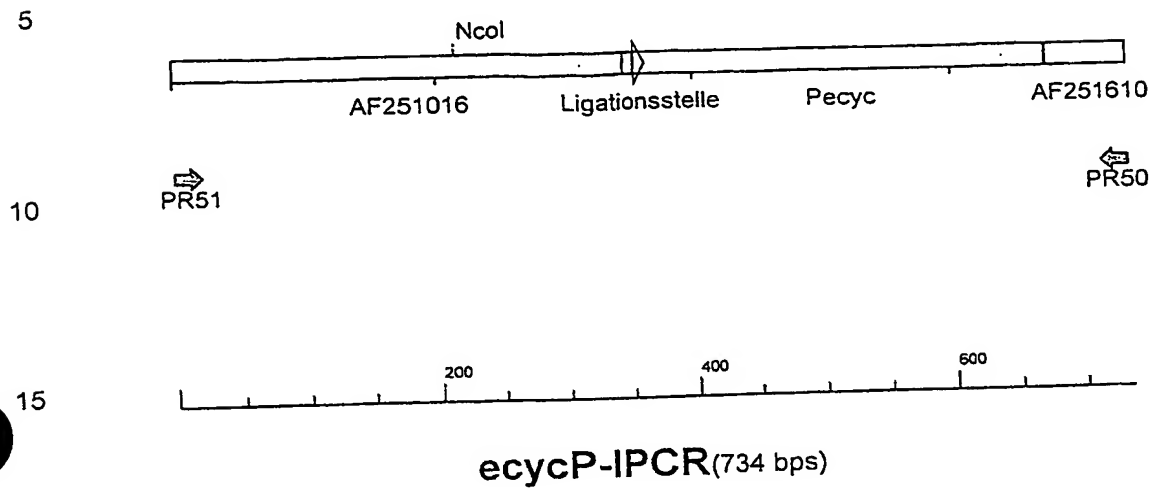


Abbildung 12: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment
des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

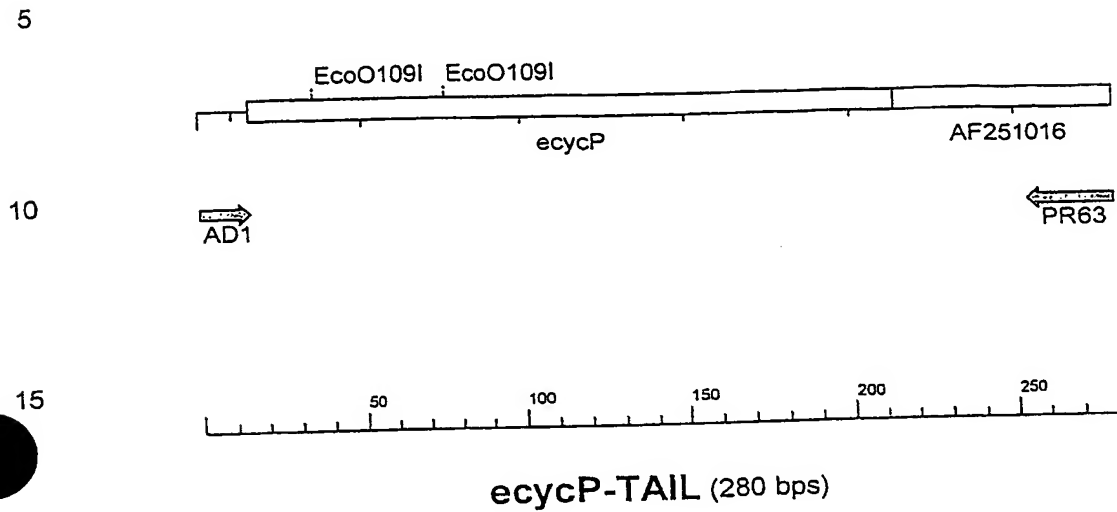


Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp 5' Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

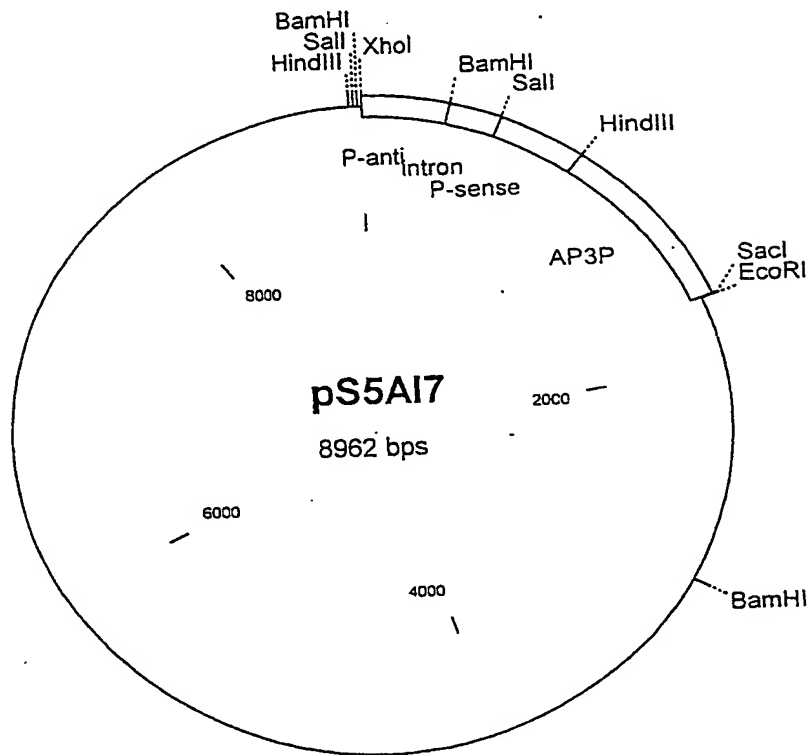


Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

5

10

15

20

25

30

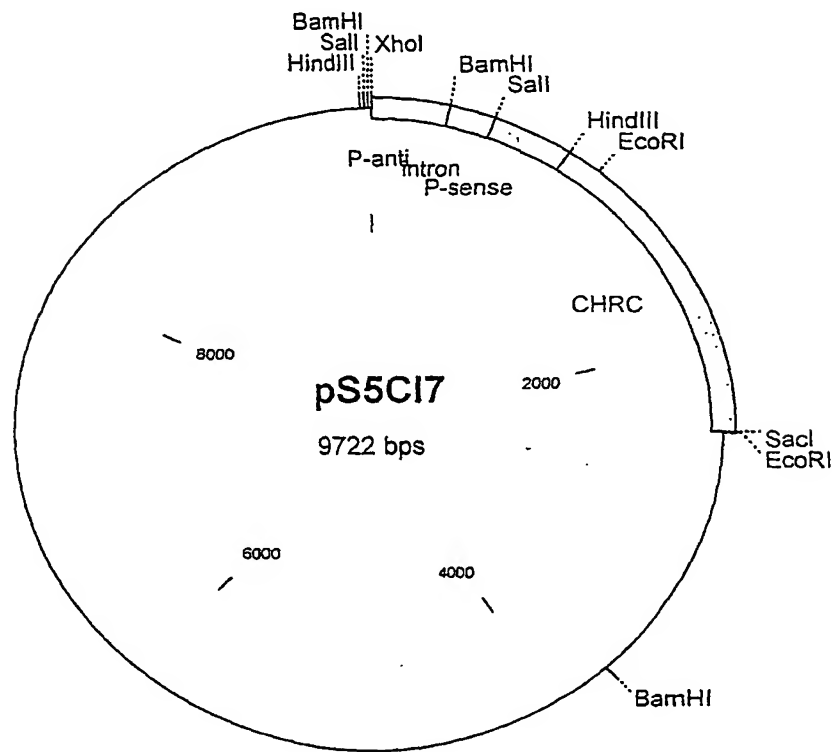


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters

5

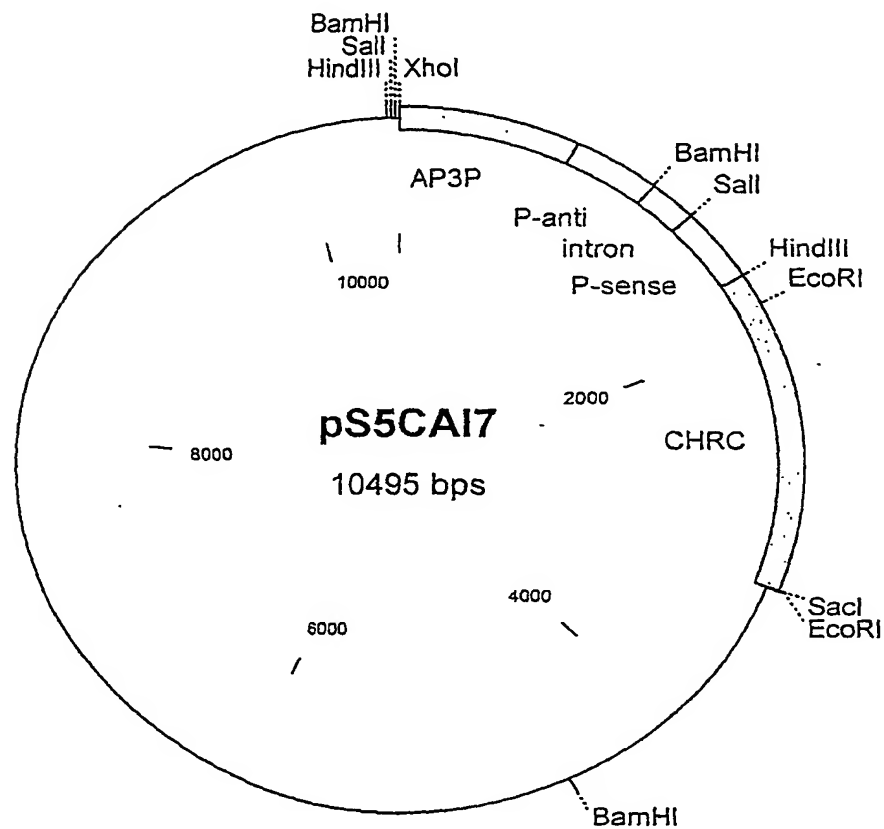
10

15

20

25

30



Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren

10

zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

Fischfutter.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH Co. KGaA

<120> Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

<130> PF 54148

<160> 96

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1155)

<223>

400> 1	gcacgagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccgggc cacagcctca	60
	aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac	120
	ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca	177
		Met Gln Leu Ala
		1
	gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag	225
	Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys	
	5 10 15 20	
	gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg	273
	Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp	
	25 30 35	
	gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg	321
	Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro	
	40 45 50	
	gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc	369
	Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile	

55

60

aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac 417
Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Val Phe Leu His
70 75 80

gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg 465
Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp
85 90 95 100

ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc 513
Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser
105 110 115

ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca 561
Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr
120 125 130

ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg 609
Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met
135 140 145

aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg 657
Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu
150 155 160

tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac 705
Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His
165 170 175 180

cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga 753
His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly
185 190 195

aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg 801
Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Tyr Met
200 205 210

tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag 849
Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln
215 220 225

ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcc 897
Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala
230 235 240

atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc 945
Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro
245 250 255 260

cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg 993
His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met
265 270 275

aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt 1041
Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe
280 285 290

ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc 1089
Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro
295 300 305

ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga 1137
Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg
310 315 320

ggc ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgccca 1185
Gly Leu Val Pro Ala

Fischfutter.ST25.txt

325

```

gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245
gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg tttgtagctg 1305
tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gagtacaccc acaggccaac 1365
acccttgcatg gagatgtctt gcgtcgggag gagtgttggg cagtgtagat gctatgattg 1425
tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485
aagggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcggtgg caggcagggtg aagaggtgcg 1545
ggaggggtggt gccacaccca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605
agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 1665
agatactggg caggcagggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725
ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 1771

```

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

```

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1          5          10          15

```

```

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
          20          25          30

```

```

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
          35          40          45

```

```

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
          50          55          60

```

```

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65          70          75          80

```

```

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
          85          90          95

```

```

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
          100          105          110

```

```

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
          115          120          125

```

```

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
          130          135          140

```

130

135

140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220

Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
 305 310 315 320

Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 325

<210> 3

<211> 1662

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (168)..(1130)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

```

<400> 3
cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga      60
gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg      120
ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc      176
                                         Met His Val
                                         1

gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc      224
Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser
5                               10                               15

agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc      272
Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser
20                               25                               30                               35

gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct      320
Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro
40                               45                               50

aca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc      368
Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly
55                               60                               65

acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg      416
Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro
70                               75                               80

aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc      464
Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala
85                               90                               95

cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc      512
Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe
100                               105                               110                               115

att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac      560
Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp
120                               125                               130

gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc      608
Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu
135                               140                               145

ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg      656
Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met
150                               155                               160

ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg      704
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly
165                               170                               175

aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc      752
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe
180                               185                               190                               195

gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg      800
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu
200                               205                               210

gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat      848
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn
215                               220                               225

```


Fischfutter.ST25.txt

ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc	896
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu	
230 235 240	
ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca	944
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala	
245 250 255	
gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca	992
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala	
260 265 270 275	
tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg	1040
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp	
280 285 290	
gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc	1088
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys	
295 300 305	
cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga	1130
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala	
310 315 320	
aggccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc	1190
ggccagtggc agcgcagtgct actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca	1250
ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga	1370
tgcattcagt agcgggtggcc aacgtcatgt ggatggtgga agtgctgagg ggtttaggca	1430
gccggcattt gagaggggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac	1490
acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggtt tcgtgctatt	1550
gttttattca gcagcagtac ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt	1610
gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct	1662

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His
20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala
35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr

50

55

60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile
65 70 75 80

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu
85 90 95

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala
100 105 110

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr
115 120 125

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu
130 135 140

Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp
145 150 155 160

Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly
165 170 175

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val
180 185 190

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe
195 200 205

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro
210 215 220

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala
225 230 235 240

Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro
245 250 255

Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr
260 265 270

Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp
275 280 285

Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu
290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala
305 310 315 320

Fischfutter.ST25.txt

<211> 729

<212> DNA

<213> Agrobacterium aurantiacum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 5		
atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg		48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu		
	5 10 15	
gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat		96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His		
	20 25 30	
gcg ctg tgg ttt ctg gac gca gcg gcg cat ccc atc ctg gcg atc gca		144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala		
	35 40 45	
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg		192
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala		
	50 55 60	
cat gac gcg atg cac ggg tcg gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat		240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn		
	65 70 75 80	
gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg		288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp		
	85 90 95	
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc		336
Ile Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr		
	100 105 110	
gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc		384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala		
	115 120 125	
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggc ctg ctg ctg ccc		432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro		
	130 135 140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac		480
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr		
	145 150 155 160	
gtg gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc		528
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe		
	165 170 175	
gtg ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg		576
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro		
	180 185 190	

Fischfutter.ST25.txt

gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg 624
 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
 195 200 205
 ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac 672
 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220
 ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
 225 230 235 240
 acc gca tga 729
 Thr Ala

<210> 6

<211> 242

<212> PRT

<213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 6

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
 1 5 10 15
 Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
 20 25 30
 Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala
 35 40 45
 Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
 50 55 60
 His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
 65 70 75 80
 Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95
 Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
 100 105 110
 Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125
 Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140
 Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Fischfutter.ST25.txt

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe -
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7

<211> 1631

<212> DNA

<213> Alcaligenes sp.

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(827)

<223>

<400> 7

caggccg ggcccgggtgg ccaatgggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60

gggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116
 Met Ser Gly Arg Lys Pro
 1 5

ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctg ggt ctg acc gcc gcg atc 164
 Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile
 10 15 20

ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212
 Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp
 25 30 35

gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260
 Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Ala Ala Gly Leu Thr
 40 45 50

tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308
 Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly
 55 60 65 70

Fischfutter.ST25.txt

tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg 356
 Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu
 75 80 85

gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tcg tgg ccc aag ctg atc gcc aag 404
 Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys
 90 95 100

cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc 452
 His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe
 105 110 115

ggt cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat 500
 Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr
 120 125 130

ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat 548
 Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr
 135 140 145 150

gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc 596
 Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val
 155 160 165

tcg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg 644
 Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu
 170 175 180

ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg 692
 Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg
 185 190 195

tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc 740
 Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe
 200 205 210

ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg 788
 Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp
 215 220 225 230

cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct 837
 Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala
 235 240

cattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat 897

tgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc 957

gttggagaag aacgacctct acggcgctcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac 1017

cgtgggcgcc tattggtggc cggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cggctctatgg 1077

gttgatctat ttcatcctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat 1137

tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgctgcacc acgcggctga 1197

ggggcgggac cactgctca gcttcggctt catctatgcc ccacccgtgg acaagctgaa 1257

gcaggatctg aagcggctcg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgctccgt cgtgatctct 1317

gatcccggcg tggccgcatg aaatccgacg tgctgctggc aggggcccggc cttgccaacg 1377

gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccgaact tcgctgtgtg ctgctggacc 1437

gtgcggcggg cgcctcggac gggcatactt ggtcctgcca cgacaccgat ttggcgccgc 1497

actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gcccgatcag gaggtgcggt 1557

Fischfutter.ST25.txt

tcccagacca ttcgcgaagg ctccgggccc gatattggctc gatcgacggg cgggggctga 1617
 tgcgtgcggt gacc 1631

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Alcaligenes sp.

<400> 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe
 20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu
 35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
 65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
 85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr
 100 105 110

Asp Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly
 115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu
 195 200 205

Fischfutter.ST25.txt

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly
225 230 235 240

Arg Ala

<210> 9

<211> 729

<212> DNA

<213> Paracoccus marcusii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 9

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30

gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala
35 40 45

at ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60

cat gac gcg atg cac ggc tcg gtc gtg ccg ggc cgt ccg cgc gcc aat 240
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80

gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
100 105 110

gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc 384
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
115 120 125

cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggc ctg ctg ctg ccc 432
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro

Fischfutter.ST25.txt

130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160			480
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175			528
gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190			576
gac cgc cat aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac cct gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195 200 205			624
ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210 215 220			672
ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 230 235 240			720
acc gca tga Thr Ala			729

<210> 10

<211> 242

<212> PRT

<213> Paracoccus marcusii

<400> 10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala
35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
Seite 14

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
115 120 125
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
130 135 140
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
145 150 155 160
Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
165 170 175
Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
180 185 190
p Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
195 200 205
Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
210 215 220
Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
225 230 235 240
Thr Ala

<210> 11
<211> 1629.
<212> DNA
<213> Synechococcus sp.
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1629)
<223>

<400> 11
atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta 48
Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
1 5 10 15
gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta 96
Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
20 25 30

Fischfutter.ST25.txt

gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg - Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met 35 40 45	144
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His 50 55 60	192
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln 65 70 75 80	240
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg Tyr Gly Leu Glu Tyr 85 Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly 90 95	288
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr 105 Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys 100 110	336
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln 115 120 125	384
gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe 130 135 140	432
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp 145 150 155 160	480
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala 165 170 175	528
ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn 180 185 190	576
gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys 195 200 205	624
tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg Ser Glu Ile Gly Ala Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met 210 215 220	672
atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly 225 230 235 240	720
ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln 245 250 255	768
ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu 260 265 270	816
aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg 275 280 285	864
gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu 290 295 300	912

Fischfutter.ST25.txt

caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly 305 310 315 320	960
gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys 325 330 335	1008
atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly 340 345 350	1056
ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His 355 360 365	1104
gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala 370 375 380	1152
aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met 385 390 395 400	1200
ccc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr 405 410 415	1248
cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr 420 425 430	1296
gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr 435 440 445	1344
gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu 450 455 460	1392
agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val 465 470 475 480	1440
tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu 485 490 495	1488
ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr 500 505 510	1536
ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg 515 520 525	1584
aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp 530 535 540	1629

<210> 12

<211> 542

<212> PRT

<213> Synechococcus sp.

<400> 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
 20 25 30
 Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met
 35 40 45
 Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His
 50 55 60
 Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly
 85 90 95
 Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys
 100 105 110
 Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln
 115 120 125
 Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe
 130 135 140
 Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp
 145 150 155 160
 Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala
 165 170 175
 Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn
 180 185 190
 Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys
 195 200 205
 Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met
 210 215 220
 Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln
 245 250 255

Fischfutter.ST25.txt

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu
260 265 270

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg
275 280 285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu
290 295 300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly
305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys
325 330 335

Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly
340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His
355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala
370 375 380

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met
385 390 395 400

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr
405 410 415

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr
420 425 430

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr
435 440 445

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu
450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val
465 470 475 480

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu
485 490 495

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr
500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg
515 520 525

Fischfutter.ST25.txt

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp
530 535 540

<210> 13

<211> 776

<212> DNA

<213> Bradyrhizobium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<223>

400> 13
atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48
Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg
1 5 10 15

gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96
Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Val Ile
20 25 30

atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144
Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro
35 40 45

ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192
Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln
50 55 60

acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240
Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His
65 70 75 80

ctc tgc ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288
Leu Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln
85 90 95

ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336
Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
100 105 110

gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384
Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp
115 120 125

ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432
Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
130 135 140

ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc 480
Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
145 150 155 160

tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg 528
Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

Fischfutter.ST25.txt

165															170					175					
ctg	ttc	tgg	gcg	ctg	ccc	ggg	ctg	ctg	tcg	gcg	ctg	cag	ctg	ttc	acc	576									
Leu	Phe	Trp	Ala	Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Thr										
			180					185					190												
ttc	ggc	acc	tat	ctg	ccg	cac	aag	ccg	gcc	acg	cag	ccc	ttc	gcc	gat	624									
Phe	Gly	Thr	Tyr	Leu	Pro	His	Lys	Pro	Ala	Thr	Gln	Pro	Phe	Ala	Asp										
		195					200					205													
cgc	cac	aac	gcg	cgg	acg	agc	gaa	ttt	ccc	gcg	tgg	ctg	tcg	ctg	ctg	672									
Arg	His	Asn	Ala	Arg	Thr	Ser	Glu	Phe	Pro	Ala	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu										
		210				215					220														
acc	tgc	ttc	cac	ttc	ggc	ttt	cat	cac	gag	cat	cat	ctg	cat	ccc	gat	720									
Thr	Cys	Phe	His	Phe	Gly	Phe	His	His	Glu	His	His	Leu	His	Pro	Asp										
225					230					235					240										
gcg	ccg	tgg	tgg	cgg	ctg	ccg	gag	atc	aag	cgg	cgg	gcc	ctg	gaa	agg	768									
Ala	Pro	Trp	Trp	Arg	Leu	Pro	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg										
				245					250					255											
cg	gac	ta														776									
g	Asp																								

<210> 14

<211> 258

<212> PRT

<213> Bradyrhizobium sp.

<400> 14

Met	His	Ala	Ala	Thr	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	Phe	Gly	Ala	Ser	Arg	Arg
1				5					10					15	

Asp	Asp	Ala	Arg	Gln	Arg	Arg	Val	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Ile
			20					25					30		

Ala	Ala	Trp	Leu	Val	Leu	His	Val	Gly	Leu	Met	Phe	Phe	Trp	Pro
	35					40					45			

Leu	Thr	Leu	His	Ser	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Gln
	50					55					60				

Thr	Trp	Leu	Tyr	Val	Gly	Leu	Phe	Ile	Ile	Ala	His	Asp	Cys	Met	His
65					70				75						80

Gly	Ser	Leu	Val	Pro	Phe	Lys	Pro	Gln	Val	Asn	Arg	Arg	Ile	Gly	Gln
				85					90					95	

Leu	Cys	Leu	Phe	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Ala	Leu	Asn	Val
			100					105					110		

Glu	His	His	Lys	His	His	Arg	His	Pro	Gly	Thr	Ala	Glu	Asp	Pro	Asp
Seite 21															

115

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu
165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr
180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp
195 200 205

Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Gly Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu
210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp
225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg
245 250 255

Arg Asp

<210> 15

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 15
atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta
Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
1 5 10 15

48

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
20 25 30

96

Fischfutter.ST25.txt

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144
 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu-
 35 40 45
 ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192
 Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
 50 55 60
 atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat 240
 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
 65 70 75 80
 gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat 288
 Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
 85 90 95
 ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa 336
 Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
 100 105 110
 gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat 384
 Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
 115 120 125
 a gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg 432
 Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
 130 135 140
 tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga 480
 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
 145 150 155 160
 tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa 528
 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu
 165 170 175
 aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta 576
 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt 624
 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly
 195 200 205
 ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt 672
 Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe
 210 215 220
 tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac 720
 Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
 225 230 235 240
 gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata 768
 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
 245 250 255
 tct tta taa 777
 Ser Leu

<210> 16

<211> 258

<212> PRT

<213> Nostoc sp.

<400> 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
 20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu
 35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
 50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
 65 70 75 80

Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
 85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
 100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
 115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
 130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
 145 150 155 160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu
 165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly
 195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe
 210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
 225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
 245 250 255

Fischfutter.ST25.txt

Ser Leu

<210> 17

<211> 1608

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(971)

<223>

200> 17
 ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile 15
 1 5 10

ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu 30
 20 25

tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala 45
 35 40

cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser 60
 50 55

tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcc ctg gga 239
 Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly 75
 65 70

gtc gtc cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca 287
 Val Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala 95
 85 90

ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa 335
 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys 110
 100 105

cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att gcc 383
 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly 125
 115 120

gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac 431
 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His 140
 130 135

atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc 479
 Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu 155
 145 150

ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat 527
 Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr
 Seite 25

Fischfutter.ST25.txt

160	165	170	175	
gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac				575
Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	180	185	190	
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg				623
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	195	200	205	
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc				671
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	210	215	220	
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg				719
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	225	230	235	
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg				767
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	240	245	250	255
gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg				815
Ala His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	260	265	270	
gag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt				863
Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	275	280	285	
ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att				911
Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	290	295	300	
cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg				959
Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	305	310	315	
tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg				1011
Ser Lys Arg	320			
tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actggtctga				1071
tggccaatgg catcggccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg				1131
catcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc				1191
gctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggg tgtgaagcaa tgactccgcc				1251
catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta				1311
gtgcagcaaa ctatattcac ctagggctgt tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg				1371
catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc				1431
agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattcctt tgagagggga				1491
ggctcgtgcc agaaatgggt agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga				1551
tgactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa				1608
<210>	18			
<211>	322			
<212>	PRT			

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 18

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
 1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
 20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
 35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
 50 55 60

Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
 70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
 85 90 95

Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
 100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
 115 120 125

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
 130 135 140

Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
 145 150 155 160

Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
 165 170 175

His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
 180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
 195 200 205

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe
 210 215 220

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
 225 230 235 240

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val
 Seite 27

245

250

255

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
 260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
 275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
 290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
 305 310 315 320

Lys Arg

<210> 19

<211> 1503

<212> DNA

<213> Tomato

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 19

atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca 48
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
 5 10 15

tct cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96
 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
 20 25 30

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144
 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
 35 40 45

tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc 192
 Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
 50 55 60

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa 240
 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
 65 70 75 80

ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt 288
 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
 85 90 95

Fischfutter.ST25.txt

gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile 100 105 110	336
gat ccg aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val 115 120 125	384
gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp 130 135 140	432
tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His 145 150 155 160	480
aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met 165 170 175	528
cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile 180 185 190	576
gtg att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly 195 200 205	624
att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg 210 215 220	672
tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala 225 230 235 240	720
tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys 245 250 255	768
atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp 260 265 270	816
ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro 275 280 285	864
tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg 290 295 300	912
cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu 305 310 315 320	960
aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys 325 330 335	1008
cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val 340 345 350	1056
gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met 355 360 365	1104

Fischfutter.ST25.txt

gtg	gca	agg	aca	cta	gct	gcg	gct	cct	gtt	gtt	gcc	aat	gcc	ata	att	1152
Val	Ala	Arg	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Asn	Ala	Ile	Ile	
	370					375					380					
caa	tac	ctc	ggt	tct	gaa	aga	agt	cat	tcg	ggt	aat	gaa	tta	tcc	aca	1200
Gln	Tyr	Leu	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Gly	Asn	Glu	Leu	Ser	Thr	
385					390					395					400	
gct	gtt	tgg	aaa	gat	ttg	tgg	cct	ata	gag	agg	aga	cgt	caa	aga	gag	1248
Ala	Val	Trp	Lys	Asp	Leu	Trp	Pro	Ile	Glu	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Glu	
				405					410					415		
ttc	ttc	tgc	ttc	ggt	atg	gat	att	ctt	ctg	aag	ctt	gat	tta	cct	gct	1296
Phe	Phe	Cys	Phe	Gly	Met	Asp	Ile	Leu	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Pro	Ala	
			420					425					430			
aca	aga	agg	ttc	ttt	gat	gca	ttc	ttt	gac	tta	gaa	cct	cgt	tat	tgg	1344
Thr	Arg	Arg	Phe	Phe	Asp	Ala	Phe	Phe	Asp	Leu	Glu	Pro	Arg	Tyr	Trp	
		435					440					445				
cat	ggc	ttc	tta	tcg	tct	cga	ttg	ttt	cta	cct	gaa	ctc	ata	gtt	ttt	1392
His	Gly	Phe	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Leu	Ile	Val	Phe	
	450					455					460					
ctg	tct	cta	ttc	tct	cat	gct	tca	aat	act	tct	aga	ttt	gag	ata		1440
Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	His	Ala	Ser	Asn	Thr	Ser	Arg	Phe	Glu	Ile		
465				470					475				480			
atg	aca	aag	gga	act	gtt	cca	tta	gta	aat	atg	atc	aac	aat	ttg	tta	1488
Met	Thr	Lys	Gly	Thr	Val	Pro	Leu	Val	Asn	Met	Ile	Asn	Asn	Leu	Leu	
				485					490					495		
cag	gat	aaa	gaa	tga												1503
Gln	Asp	Lys	Glu													
			500													

<210> 20

<211> 500

<212> PRT

<213> Tomate

<214> 20

Met	Asp	Thr	Leu	Leu	Lys	Thr	Pro	Asn	Asn	Leu	Glu	Phe	Leu	Asn	Pro
1				5					10					15	
His	His	Gly	Phe	Ala	Val	Lys	Ala	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Glu	Lys	His
			20					25					30		
His	Asn	Phe	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Cys	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Ser	Val
		35					40					45			
Cys	Val	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Val	Pro	Glu	Thr
	50					55					60				
Lys	Lys	Glu	Asn	Leu	Asp	Phe	Glu	Leu	Pro	Met	Tyr	Asp	Pro	Ser	Lys
65					70					75					80

Fischfutter.ST25.txt

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu-
85 90 95

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
130 135 140

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
165 170 175

Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
180 185 190

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
195 200 205

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
210 215 220

Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
245 250 255

Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
260 265 270

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro
275 280 285

Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg
290 295 300

Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu
305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys
325 330 335

Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val
340 345 350

Fischfutter.ST25.txt

Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met
355 360 365

Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
405 410 415

Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
420 425 430

Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
435 440 445

Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
485 490 495

Gln Asp Lys Glu
500

<210> 21

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 21
tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60
atataatatt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120
ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180

gttgatgtgc agctg

<210> 22

<211> 1155

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(995)

<223>

100> 22
 agc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser 15
 1 5 10

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp 30
 20 25

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser 45
 35 40

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194
 Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser 60
 50 55

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc 242
 Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala 75
 65 70

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290
 Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu 95
 85 90

ac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt 338
 Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val 110
 100 105

agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg 386
 Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu 125
 115 120

gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat 434
 Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His 140
 130 135

ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga 482
 Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg 155
 145 150

gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc 530
 Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg 175
 160 165 170

Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578
Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro
180 185 190
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe
195 200 205
atg tcc agc tac atg tgc atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp
210 215 220
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val
225 230 235
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe
240 245 250 255
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser
260 265 270
cca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tgc cgc act agc cag gcg tcc 866
Pro Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser
275 280 285
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu
290 295 300
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg
305 310 315
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
320 325
cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc 1075
gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135
ttttagctg tgcagcttgc 1155

<210> 23

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
Seite 35

305

310

320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

<210> 24

<211> 1111

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(951)

<223>

<400> 24
tgc atg cta gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc 48
Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser 15
1

tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa 96
Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu 30
20

gag tca gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca 144
Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro 45
35

cct tcc gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc 192
Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser 60
50

tgg gcc gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc 240
Trp Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr 75
65

acc ttg gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag 288
Ser Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln 95
80

ctg gtt agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt 336
Leu Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe 110
100

gtc ctg gag ttc ctg tac aca gcc ctt ttt atc acc acg cat gat gct 384
Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala 125
115

atg cat ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg 432
Met His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu 140
130

ggc aga gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg 480
Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu 155
145

Fischfutter.ST25.txt

cac cgC aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag 528
 His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys
 160 165 170 175
 gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc 576
 Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala
 180 185 190
 agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca 624
 Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala
 195 200 205
 tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg 672
 Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu
 210 215 220
 ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc 720
 Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe
 225 230 235
 tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca 768
 Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser
 240 245 250 255
 tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag 816
 Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln
 260 265 270
 gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac 864
 Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His
 275 280 285
 tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac 912
 Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn
 290 295 300
 tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac 961
 Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 305 310 315
 tgcagtgggc cctgctgcc gctgggcatg cagggttgagg caggactggg tgaggtgaaa 1021
 agctgcaggc gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta 1081
 ggggagggggg tttgtagctg tcgagcttgc 1111

<10> 25

<211> 315

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser
1 5 10 15

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu
20 25 30

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro
Seite 37

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp
50 55 60

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser
65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu
85 90 95

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val
100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met
115 120 125

His Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly
130 135 140

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His
145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp
165 170 175

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser
180 185 190

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp
195 200 205

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu
210 215 220

Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr
230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly
245 250 255

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala
260 265 270

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp
275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys
290 295 300

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
seite 38

305

310

<210> 26

<211> 1031

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(1031)

<223>

400> 26

```

agc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50
  Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser
  1 5 10 15

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98
Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp
20 25 30

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146
Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser
35 40 45

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194
Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser
50 55 60

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct 242
Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala
65 70 75

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290
Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu
85 90 95

gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt 338
Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val
100 105 110

agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg 386
Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu
115 120 125

gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat 434
Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His
130 135 140

ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga 482
Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg
145 150 155

gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc 530
Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg
160 165 170 175

```

Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578
Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro
180 185 190
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe
195 200 205
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp
210 215 220
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val
225 230 235
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe
240 245 250 255
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser
260 265 270
a cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866
r Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser
275 280 285
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu
290 295 300
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg
305 310 315
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca 1010
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
320 325 330 335
gaa gag gat ctg aat agc tag 1031
Glu Glu Asp Leu Asn Ser
340

<210> 27

<211> 341

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Fischfutter.ST25.txt

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Trp Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Fischfutter.ST25.txt

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 325 330 335

Glu Asp Leu Asn Ser
 340

<210> 28

<211> 777

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 28	
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt	60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga	120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga	180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta	240
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgta	300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca	360
tatatatctc tttcttctta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta	420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgc	480
aaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt	540
gttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta	600
tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt	660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact	720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaata tcttcaacaa aaagctt	777

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 29

gcaagctcga cagctacaaa cc

22

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 30

gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 31

tgcatgctag aggcactcaa ggagaaggag

30

<210> 32

<211> 59

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(59)

<223>

<400> 32
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc 59

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 33
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 34

<211> 37

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 34
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 35

<211> 34

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 35
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 36
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 37

<211> 212

<212> DNA

<213> Kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(212)

<223>

<400> 37
gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta

60

Fischfutter.ST25.txt

gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgaacca 180
aaatttggtg atgtgcaggt atcaccggat cc 212

<210> 38

<211> 1830

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> CDS

<222> (141)..(1691)

<223>

<400> 38
ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttggtg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60

gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120

agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr
1 5 10

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr
15 20 25

aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln
30 35 40

gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg 317
Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu
45 50 55

ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc 365
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser
60 65 70 75

cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt 413
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser
80 85 90

aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt 461
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu
95 100 105

gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc 509
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile
110 115 120

ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa 557
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu
125 130 135

Fischfutter.ST25.txt

ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat	605
Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp	
140 145 150 155	
act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc	653
Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala	
160 165 170	
tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg	701
Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg	
175 180 185	
tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att	749
Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile	
190 195 200	
act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc	797
Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile	
205 210 215	
aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga	845
Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly	
220 225 230 235	
gaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893
Gly Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr	
240 245 250	
gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941
Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser	
255 260 265	
cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989
Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln	
270 275 280	
tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037
Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser	
285 290 295	
cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085
Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala	
300 305 310 315	
atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act	1133
Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr	
320 325 330	
atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att	1181
Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile	
335 340 345	
cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt	1229
Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe	
350 355 360	
ggt gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta	1277
Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val	
365 370 375	
aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att	1325
Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile	
380 385 390 395	
tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca	1373
Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr	
400 405 410	

Fischfutter.ST25.txt

acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg 1421
 Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg
 415 420 425

aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag 1469
 Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln
 430 435 440

atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu
 445 450 455

ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr
 460 465 470 475

gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser
 480 485 490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly
 495 500 505

atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcatcag 1711
 Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile
 510 515

tttagattat aggcacatct tgcataatata tatgtataaaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771

tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

<210> 39

<211> 516

<212> PRT

<213> Tagetes erecta

<400> 39

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr
 5 10 15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys
 20 25 30

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu
 35 40 45

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met
 50 55 60

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu
 65 70 75 80

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp
 85 90 95

Fischfutter.ST25.txt

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu-
 100 105 110
 Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro
 115 120 125
 Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly
 130 135 140
 Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu
 145 150 155 160
 Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser
 165 170 175
 Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly
 180 185 190
 Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn
 195 200 205
 Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg
 210 215 220
 Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr
 225 230 235 240
 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu
 245 250 255
 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met
 260 265 270
 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln
 275 280 285
 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe
 290 295 300
 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile
 325 330 335
 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser
 340 345 350
 Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser
 355 360 365

Fischfutter.ST25.txt

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu
370 375 380

Ala pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn
385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys
405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala
420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly
435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp
450 455 460

Phe Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe
465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu
485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala
500 505 510

Tyr Leu Thr Ile
515

<210> 40

<211> 445

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Fragment

<222> (1)..(445)

<223>

<400> 40
aagcttgac gaggcaaagc aaagggttggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc 60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatattc tctctcggtc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180

Fischfutter.ST25.txt

ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
 caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
 gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaaa cagaataagt ccatggatgc 360
 acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
 ctgtatactg gatttggttg tcgac 445

<210> 41

<211> 446

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1)..(446)

<223>

<400> 41
 gaattcgcac gaggcaaagc aaagggtggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc 60
 aaacagatac aaggcgtgac tggatatctc tctctcggtc ctaacaacag caacgaagaa 120
 gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180
 ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
 caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
 gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaaa cagaataagt ccatggatgc 360
 acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
 gtatactg gatttggttg gaccc 446

<210> 42

<211> 393

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Fragment

<222> (1)..(393)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

```
<400> 42
aagcttttga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg 60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtgggggttt cttggatctt cgttatcatc 120
aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180
gggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240
cacgatataa ataactctag tcgcatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata 300
tatgtataaa ctttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393
```

<210> 43

<211> 397

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1)..(397)

<223>

```
<400> 43
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60
tccggacttt ctccgcttg cccacatgga tgtgggtggg gtttcttga tcttcgttat 120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180
gaatgggtct ggttagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240
cttcacgat ataaataact ctagtcgca tcagtttaga ttataggcac atcttgcata 300
tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360
ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397
```

<210> 44

<211> 1537

<212> DNA

<213> -

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1537)

Fischfutter.ST25.txt

<223>

```

<400> 44
gagctctaca aattagggtt actttattca tttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctacttttct tattcatacc 120
tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180
tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc 240
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300
aatacaaata aagtgaacaa aaatatctat aaataaacia atatatatat tttgttagac 360
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg 420
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480
taaaccctat ttaaataagt aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540
ttgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattta aataaaaaag actaataaat 720
atataaaatg aatgttcata cgcagaccca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctcaacaggt tcaatagtca 1020
atattagggt ttattggact ttaatatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140
cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcatat gcttcggttg gctcgttta 1200
ctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta 1260
acaagccacg ttgctgtcca ttgccaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320
acctcaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcgaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380
ttgaattcta tttctcttta ttaatatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440
taaaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500
gtttctctga ttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

```

<210> 45

<211> 734

<212> DNA

<213> kuenstliche sequenz

Fischfutter.ST25.txt

<220>

<221> variation

<222> (1)..(734)

<223>

<400> 45

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc	60
cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc	120
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtaggatcg	180
gagctgcttt ttgttcaaat gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc	240
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat	300
gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtggtgtg cagctcccaa gggctcttacc	360
agtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg	420
agagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgttga atgaggttaa atggagtta	480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggatgatggg gatattaaag acggscaata	540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct	600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta	660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggtttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa	720
acagatacaa ggcg	734

<210> 46

<211> 280

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> variation

<222> (1)..(280)

<223>

<400> 46

gtcagagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat	60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acatacaacg	120
tggcttttaa agatggcttg gctgctaatac aactcaactc aactcatatc ctatccattc	180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggtgt ttgttggtgt	240

tgttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga

280

<210> 47

<211> 358

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

<223>

<210> 47
 cttaccg atagtaaaat cgtagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60
 gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgaggttaaa 120
 tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180
 cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240
 aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300
 tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggtt tttgttggtt ttgtcgac 358

<210> 48

<211> 361

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Promotor

<222> (1)..(361)

<223>

<400> 48
 ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60
 taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgaggtt 120
 aaatggagtt taattaaaaa aaagagaaga gaaagattaa gagggatgat gggatattaa 180
 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240
 taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca tatcctatcc attcaaattc 300

Fischfutter.ST25.txt

aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgatc 360
c 361

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 49
gagtcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 50
<211> 37
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(37)
<223>

<400> 50
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 51
<211> 34
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(34)

<223>

<400> 51
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 52
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 53
gaaaatactt catcagcatt acc

23

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 54
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 55
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 56
aagcttgac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

Fischfutter.ST25.txt

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 57
gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 58
aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 59
gaattcgac gaggcaaagc aaagggttg

28

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 60

aagcttttggga ttagcactga ttgtc

25

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 61

gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 62

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 62

ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 63
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>
 <221> Primer
 <222> (1)..(27)
 <223>

<400> 63
 gattctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 64
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>
 <221> Primer
 <222> (1)..(23)
 <223>

<400> 64
 ccttgat ctgtttggat tgg

23

<210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> kuenstliche sequenz

<220>
 <221> Primer
 <222> (1)..(24)
 <223>

<400> 65
ctaacaatca atgagtatga gagc

24

<210> 66

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 66
agagcaaggc cagcaggacc acaacc

26

<210> 67

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 67
ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

Fischfutter.ST25.txt

<223>

<400> 68
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 69

<211> 15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(15)

<223>

<400> 69
gtcgagtatg gagtt

15

<210> 70

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 70
aagcttaccg atagtaaaat cgttagtt

28

<210> 71

<211> 31

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

Fischfutter.ST25.txt

<221> Primer

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 71
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t

31

<210> 72

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<400> 72
cgacaaca acaacaaca acctttgc

28

<210> 73

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 73
ggatccaaca acaacaaca acctttgc

28

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 74
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 75
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 76
gagctctaca aattagggtt ac

22

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

Fischfutter.ST25.txt

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 77

aagcttatta tttccaaatt ccg

23

<210> 78

<211> 50

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<21> Primer

<22> (1)..(50)

<223>

<400> 78

aagctttgca attcatacag aagtggagaaa aatgcagcta gcagcgacag

50

<210> 79

<211> 1062

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<21> CDS

<222> (32)..(1021)

<223>

<400> 79

aagctttgca attcatacag aagtggagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val
1 5

52

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag
Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu
10 15 20

100

aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag
Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln
25 30 35

148

Fischfutter.ST25.txt

tac Tyr 40	tcg Ser	ctt Leu	ccg Pro	tca Ser	gag Glu 45	gag Glu	tca Ser	gac Asp	gcg Ala	gcc Ala 50	cgc Arg	ccg Pro	gga Gly	ctg Leu	aag Lys 55	196
aat Asn	gcc Ala	tac Tyr	aag Lys 60	cca Pro	cca Pro	cct Pro	tcc Ser	gac Asp	aca Thr 65	aag Lys	ggc Gly	atc Ile	aca Thr	atg Met 70	gcg Ala	244
cta Leu	gct Ala	gtc Val	atc Ile 75	ggc Gly	tcc Ser	tgg Trp	gcc Ala	gca Ala 80	gtg Val	ttc Phe	ctc Leu	cac His	gcc Ala 85	att Ile	ttt Phe	292
caa Gln	atc Ile	aag Lys 90	ctt Leu	ccg Pro	acc Thr	tcc Ser	ttg Leu 95	gac Asp	cag Gln	ctg Leu	cac His	tgg Trp 100	ctg Leu	ccc Pro	gtg Val	340
tca Ser	gat Asp 105	gcc Ala	aca Thr	gct Ala	cag Gln	ctg Leu 110	gtt Val	agc Ser	ggc Gly	agc Ser	agc Ser	agc Ser	ctg Leu	ctg Leu	cac His	388
atc Ile 120	gtc Val	gta Val	gta Val	ttc Phe	ttt Phe 125	gtc Val	ctg Leu	gag Glu	ttc Phe	ctg Leu 130	tac Tyr	aca Thr	ggc Gly	ctt Leu	ttt Phe 135	436
acc Thr	acg Thr	cat His	gat Asp 140	gct Ala	atg Met	cat His	ggc Gly	acc Thr 145	atc Ile	gcc Ala	atg Met	aga Arg	aac Asn 150	agg Arg		484
cag Gln	ctt Leu	aat Asn	gac Asp 155	ttc Phe	ttg Leu	ggc Gly	aga Arg	gta Val 160	tgc Cys	atc Ile	tcc Ser	ttg Leu	tac Tyr 165	gcc Ala	tgg Trp	532
ttt Phe	gat Asp 170	tac Tyr	aac Asn	atg Met	ctg Leu	cac His	cgc Arg 175	aag Lys	cat His	tgg Trp	gag Glu	cac His 180	cac His	aac Asn	cac His	580
act Thr	ggc Gly 185	gag Glu	gtg Val	ggc Gly	aag Lys	gac Asp 190	cct Pro	gac Asp	ttc Phe	cac His	agg Arg 195	gga Gly	aac Asn	cct Pro	ggc Gly	628
att Ile 200	gtg Val	ccc Pro	tgg Trp	ttt Phe	gcc Ala 205	agc Ser	ttc Phe	atg Met	tcc Ser	agc Ser 210	tac Tyr	atg Met	tcg Ser	atg Met	tgg Trp 215	676
cag Gln	ttt Phe	geg Ala	cgc Arg	ctc Leu 220	gca Ala	tgg Trp	tgg Trp	acg Thr	gtg Val 225	gtc Val	atg Met	cag Gln	ctg Leu	ctg Leu 230	ggt Gly	724
gcg Ala	cca Pro	atg Met	gcg Ala 235	aac Asn	ctg Leu	ctg Leu	gtg Val	ttc Phe 240	atg Met	gcg Ala	gcc Ala	gcg Ala	ccc Pro 245	atc Ile	ctg Leu	772
tcc Ser	gcc Ala	ttc Phe 250	cgc Arg	ttg Leu	ttc Phe	tac Tyr	ttt Phe 255	ggc Gly	acg Thr	tac Tyr	atg Met	ccc Pro 260	cac His	aag Lys	cct Pro	820
gag Glu	cct Pro 265	ggc Gly	gcc Ala	gcg Ala	tca Ser	ggc Gly 270	tct Ser	tca Ser	cca Pro	gcc Ala	gtc Val 275	atg Met	aac Asn	tgg Trp	tgg Trp	868
aag Lys 280	tcg Ser	cgc Arg	act Thr	agc Ser	cag Gln 285	gcg Ala	tcc Ser	gac Asp	ctg Leu	gtc Val 290	agc Ser	ttt Phe	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys 295	916
tac Tyr	cac His	ttc Phe	gac Asp	ctg Leu 300	cac His	tgg Trp	gag Glu	cac His	cac His 305	cgc Arg	tgg Trp	ccc Pro	ttt Phe	gcc Ala 310	ccc Pro	964

Fischfutter.ST25.txt

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val
 315 320 325

cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg c 1062
 Pro Ala

<210> 80

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 80

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Fischfutter.ST25.txt

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

<210> 81

<211> 789

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 81

ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa
Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15

48

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta
Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
20 25 30

96

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat
Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn

144

Fischfutter.ST25.txt

35	40	45	
tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60			192
atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 65 70 75 80			240
ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser 85 90 95			288
cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys 100 105 110			336
aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp 115 120 125			384
ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe 130 135 140			432
atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160			480
ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175			528
tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190			576
ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205			624
ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220			672
at tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240			720
gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn 245 250 255			768
aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260			789

<210> 82

<211> 262

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

Fischfutter.ST25.txt

<400> 82

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
65 70 75 80

Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser

<210> 83
 <211> 762
 <212> DNA
 <213> Nostoc punctiforme

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(762)
 <223>

atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca	48
Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro	
1 5 10 15	
gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc	96
Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val	
20 25 30	
att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac	144
Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp	
35 40 45	
atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa	192
Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln	
50 55 60	
aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat	240
Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His	
65 70 75 80	
ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca	288
Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	
85 90 95	
ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa	336
Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys	
100 105 110	
aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat	384
Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp	
115 120 125	
ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt	432
Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe	
130 135 140	
atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att	480
Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile	
145 150 155 160	
tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act	528
Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr	
165 170 175	

Fischfutter.ST25.txt

tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat	576
Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr	
180 185 190	
ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag	624
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln	
195 200 205	
cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc	672
Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile	
210 215 220	
acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat	720
Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
225 230 235 240	
att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag	762
Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys	
245 250	

<210> 84

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 84

Met Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
1 5 10 15

Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val
20 25 30

Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Leu Ser Leu Asp
35 40 45

Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
50 55 60

Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
65 70 75 80

Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
85 90 95

Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
100 105 110

Lys His Trp Leu His His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
115 120 125

Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
130 135 140

Fischfutter.ST25.txt

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Le Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
245 250

<210> 85

<211> 804

<212> DNA

<213> Synechococcus WH8102

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 85
atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac 48
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
1 5 10 15

cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc 96
Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
20 25 30

ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc 144
Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg 192
Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg 240
Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu

Fischfutter.ST25.txt

65	70	75	80	
ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat				288
Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His				
	85	90	95	
ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca				336
Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala				
	100	105	110	
ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg				384
Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu				
	115	120	125	
gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac				432
Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn				
	130	135	140	
aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg				480
Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met				
	145	150	155	
gca caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc				528
Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu				
	165	170	175	
aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc				576
Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Phe Ser				
	180	185	190	
gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc				624
Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr				
	195	200	205	
tgg tta ccc cac cga cgt ggc gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg				672
Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr				
	210	215	220	
cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac				720
Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn				
	225	230	235	
ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tgc cct tcc aca ccc tgg ttt				768
Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe				
	245	250	255	
g ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga				804
Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr				
	260	265		

<210> 86

<211> 267

<212> PRT

<213> Synechococcus WH8102

<400> 86

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
 1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
 Seite 75

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
 35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
 50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
 85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
 100 105 110

Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu
 115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
 130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
 145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
 165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
 195 200 205

Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
 210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
 260 265

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

Fischfutter.ST25.txt

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 87
gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga

33

<210> 88

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 88
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac cat

33

<210> 89

<211> 805

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> variation

<222> (1)..(805)

<223>

<400> 89
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactgggtgt
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggatatattt attgcctgct

60

120

Fischfutter.ST25.txt

```

ttatcttatt tttatgggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa 180
ttcataagag cttattaggt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat 240
ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata 300
attttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga 360
aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg 420
gtcatcccca aaacttcttt ctttggtatc tacattttat gaagtcttat tggcgatgga 480
cgcaaatttt cggattagtg atgatttttc atggacttaa aaatctggtg catataccag 540
aaaataattt aattatattt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt 600
attttggtac attttgcct cataaaaage tagaagggtg ttatactaac cccattgtg 660
cgcgagat cccattacct cttttttggt cttttgttac ttgttatcac ttcggctacc 720
acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtggaa attacctgaa gtcacaaaa 780
tatctttata aggtctagag catgc 805

```

<210> 90

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(35)

<223>

<400> 90

gctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgacc

35

<210> 91

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(44)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 91
aagcttgagc tcggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact 44

<210> 92

<211> 653

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

<223>

<400> 92
gagctcttca ttatttcgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttgttgtg 60
taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt 120
tctctggctg atcttttctg tacagattca tatatctgca gagacgatat cattgattat 180
ttgagcttct ttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa 240
actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggaggga tgactccatg tcaaaataga 300
tgtcataaga ggcccatcaa taagtgcctg agcccattag ctagcccagt aactaccaga 360
ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt ttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag 420
gcgcatgaaa ggctaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaact 480
tggcctcaca ttgcccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatatc 540
tcccgccta atcttttttct ttgatctttt tttttttgct tattattttt ttgactttga 600
tcccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt 653

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 93
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 94

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 94
aagcttgagc tctttgttga agagatttgg

30

<210> 95

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 95
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 96

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 96
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.